

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA  
LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA E DOENÇAS  
INFECCIOSAS**

Ingrid Larissa Melo de Souza

**ESTUDO *IN VITRO* DAS CITOCINAS ENVOLVIDAS NA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS MURINOS À  
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE**

Florianópolis-SC

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E  
PARASITOLOGIA  
LABORATÓRIO DE IMUNOBIOLOGIA E DOENÇAS  
INFECCIOSAS**

Ingrid Larissa Melo de Souza

**“ESTUDO *IN VITRO* DAS CITOCINAS ENVOLVIDAS NA  
RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE MACRÓFAGOS MURINOS À  
INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE”**

Trabalho apresentado para o  
cumprimento da disciplina Trabalho de  
Conclusão de Curso II (BIO 7016),  
como requisito necessário à obtenção  
do título de Bacharel em Ciências  
Biológicas pela Universidade Federal  
de Santa Catarina.  
Orientador: Prof. Dr. Daniel Santos  
Mansur.

Florianópolis-SC

2012

## FICHA CATALOGRÁFICA

Melo de Souza, Ingrid Larissa

Estudo *in vitro* das citocinas envolvidas na resposta inflamatória de macrófagos murinos à infecção pelo vírus da dengue. / Ingrid Larissa Melo de Souza. – Florianópolis, 2012

Orientador: Daniel Santos Mansur.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação)- Universidade Federal de Santa Catarina – Curso de Graduação em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia.

1. *Dengue virus* 2. Macrófagos 3. Resposta inflamatória

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
COORDENADORIA DO CURSO DE GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS

BIO-7016 / ESTÁGIO II

**ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO  
DE CURSO**

**1. ESTAGIÁRIO(A)**

Nome: **Ingrid Larissa Melo de Souza**

Número de Matrícula: **07128031**

**2. ESTÁGIO**

Título do Trabalho: **ESTUDO *IN VITRO* DAS CITOCINAS  
ENVOLVIDAS NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA DE  
MACRÓFAGOS MURINOS À INFECÇÃO PELO VÍRUS DA  
DENGUE**

Orientador(a): **Daniel Santos Mansur**

Co-Orientador(a):

Período do Estágio: **06/03/2012 a 09/08/2012**

Local da apresentação do Trabalho: **Sala MIP 008**

**3. AVALIAÇÃO**

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: **Prof. Dr. Daniel Santos Mansur**

Nota: \_\_\_\_\_

Membro Titular: **Prof. Dr. Fernando Spiller**

Nota: \_\_\_\_\_

Membro Titular: **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Patrícia Hermes Stoco**

Nota: \_\_\_\_\_

Membro Suplente: **Prof. Dr. Fabrício de Souza Neves**

Nota: \_\_\_\_\_

**MÉDIA FINAL:** \_\_\_\_\_ ( \_\_\_\_\_ )

**Florianópolis, 09 de Agosto de 2012.**

\_\_\_\_\_  
PRESIDENTE DA BANCA

\_\_\_\_\_  
MEMBRO TITULAR

\_\_\_\_\_  
MEMBRO TITULAR

\_\_\_\_\_  
MEMBRO SUPLENTE



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar forças para lutar e por tantas oportunidades e alegrias.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Daniel Santos Mansur, pela oportunidade a mim concedida para realizar iniciação científica e estágio do TCC, e, principalmente, pelos ensinamentos científicos que me passou. Obrigada pela orientação, pela ajuda com os experimentos, pela disponibilização de materiais e reagentes, pela boa convivência em laboratório e por me ensinar a sempre ter paciência. Certamente, todo o aprendizado que obtive neste período contribuiu para a minha formação acadêmica e profissional.

Ao Prof. Dr. André Luiz Barbosa Báfica, pela oportunidade a mim concedida para realizar os experimentos do TCC no Laboratório de Imunobiologia e Doenças Infecciosas (LiDI) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), na UFSC e pela disponibilização de materiais e reagentes.

Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard, pela oportunidade a mim concedida para realizar parte dos experimentos do TCC no Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (MIP), na UFSC, pela disponibilização de materiais e reagentes.

À Professora Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos do Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ-PR) de Curitiba, Paraná pela disponibilização dos sorotipos virais utilizados neste trabalho.

Ao Daniel “Filho”, do LIDI, pela ajuda principalmente com a parte de cultura celular, troca de meio e repiques, além dos cálculos de volume e concentrações do meio de cultura e dos seus complementos.

Aos professores e a todo o pessoal do LIDI, tanto os integrantes atuais como os que passaram por lá durante o período de realização deste trabalho.

À Fernanda, Lívia, Verônica, Nicoli, Stefanny, Nicole, Mari, Paula, Renata, Gabriela, Carol, Álvaro e ao Magno do LIDI, por toda a amizade e ajuda, em tantos momentos. Obrigada por alegrarem o ambiente de trabalho.

À Cássia pela ajuda durante o tempo em que estive trabalhando comigo, pelos conselhos e pela amizade sincera.

Ao técnico Everton pela ajuda com a preparação dos materiais.

Ao pessoal do Laboratório de Protozoologia, Elisa, Aline, Ibeth, Pati, Débora, Aline, Laís, Carol, Ninna, Thaynara, por me receberem e me ajudarem em diversas situações.

Ao pessoal dos laboratórios LIA, LVA, LAMEB. Agradeço pela ajuda, disponibilização e empréstimo de equipamentos.

Aos meus pais, Marluce e Euclides, por todo apoio, amor e orientação durante toda a minha vida. Muito obrigada não apenas pelo apoio financeiro, mas, principalmente pelo apoio emocional. Não sei como agradecer todo o apoio e a dedicação de vocês para a minha formação.

Ao meu namorado Diego, por todo o amor, compreensão e pela ajuda com configurações de computador. Obrigada também por compartilhar comigo momentos de tristeza e alegria.

Ao meu querido irmão Antônio, minha gratidão pela ajuda financeira, pelo carinho e pela inspiração que me proporcionou através do seu exemplo.

À minha amiga Nancy, minha gratidão pela amizade, pelo apoio emocional e moral, pelas boas experiências de convivência, e aos “cuidados médicos” a mim dedicados sempre que foi necessário.

Aos meus amigos da Biologia, Stefanny, Cecília, Kamille, Yuri, Thaís, Bruna, Luan e Felipe. Obrigada por compartilharem os momentos difíceis e vitoriosos durante o curso.

À banca avaliadora deste trabalho, pela disposição e aceite do convite.

Ao CNPq pela contribuição financeira.

Meus agradecimentos a todos que de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho e para o desenvolvimento da minha formação durante este período.



*“O último esforço da razão é  
reconhecer que existe uma infinidade  
de coisas que a ultrapassam.”*

*(Blaise Pascal, 1814)*



## RESUMO

A dengue é uma doença que tem como agente etiológico o *Dengue virus* (DENV), da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*. Mais de 50 milhões de infecções ocorrem anualmente no mundo.

Níveis altos de diferentes citocinas foram observados na infecção por DENV. Sabe-se que após a infecção pelo DENV *in vitro*, os macrófagos, após o reconhecimento do vírus, liberam TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 fator ativador de plaquetas e histaminas. Outras citocinas também foram correlacionadas *in vivo* com a doença.

Dentre as citocinas pró-inflamatórias encontradas *in vivo* e *in vitro*, em células infectadas com o DENV ou em pacientes com a febre hemorrágica da dengue (DHF), estão o TNF- $\alpha$ , o IFN- $\gamma$ , o IFN- $\beta$ , a IL-2, a IL-4, a IL-5, a IL-6, a IL-10, o IFN- $\alpha$  e o hCF. Outros mediadores da resposta inflamatória foram encontrados em pacientes com infecção aguda pelo DENV, como a enzima NOS2. As citocinas desempenham um papel sinérgico na superfície endotelial, contribuindo para o extravasamento do plasma e os seus níveis altos resultam no quadro grave da doença.

Este estudo acompanhou, através de PCR em tempo real, as diferenças de cinética de expressão dos genes das principais citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6 e IL-12p40) e da enzima NOS2 liberadas por macrófagos murinos RAW 264.7 durante a infecção pelo DENV-1 e DENV-4 e durante o estímulo com LPS.

No presente trabalho, foram observadas diferenças nas cinéticas de expressão dos genes destas citocinas e enzima quando induzidos por DENV-1, DENV-4 e LPS. Os genes do IFN- $\beta$  e da IL-6 apresentaram expressão precoce. Os genes do TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6 e IL-12p40 apresentaram expressão intermediária, intermediária-tardia e tardia. O gene da enzima NOS2 também apresentou expressão tardia.

**Palavras-chave:** *Dengue virus*; Macrófagos; Resposta inflamatória.

## ABSTRACT

Dengue is a disease whose etiological agent is *Dengue virus* (DENV). This virus belongs to *Flaviviridae* family and *Flavivirus* genus. More than 50 million infections occur annually in the world.

Elevated levels of different cytokines were observed in *Dengue virus* infection. It is well known that after DENV *in vitro* infection, macrophages, after virus recognition, secrete TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-1 and IL-6, which is an activating factor of platelets and histamine. Other cytokines were also *in vivo* correlated with dengue disease.

Among pro-inflammatory cytokines identified *in vivo* and *in vitro*, in infected cells or in DHF patients, are TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IFN- $\alpha$  and hCF. Other mediators of the inflammatory response were observed in patients with acute DENV infection, for example, the NOS2 enzyme. The cytokines play a mutually synergistic role in endothelial surface, inducing plasma leakage and their elevated level results in dengue severity.

This study has identified, through real time PCR technique, the differences among the kinetics of genes expression of the major inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6 and IL-12p40) and of the NOS2 enzyme released by RAW 264.7 murine macrophage lineage during DENV-1 and DENV-4 infection and during LPS stimuli.

In the current study, were observed differences between the gene expression kinetics of these cytokines and enzyme when induced by DENV-1, DENV-4 and LPS. The INF- $\beta$  and IL-6 genes had early expression. The TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6 and IL-12p40 genes had intermediate, intermediate-late and late expression. The NOS2 gene also had late expression.

**Keywords:** *Dengue virus*; Macrophages; Inflammatory response

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Países e áreas de risco de transmissão da dengue em 2008.....	4
<b>Figura 2.</b> Estrutura do genoma do vírus da dengue.....	9
<b>Figura 3.</b> Organização estrutural do DENV.....	9
<b>Figura 4.</b> Estrutura do ectodomínio da proteína de envelope na partícula madura do vírus da dengue.....	10
<b>Figura 5.</b> Esquema do ciclo de vida do vírus da dengue no citoplasma.....	12
<b>Figura 6.</b> Esquema da amplificação da infecção através dos anticorpos potencializadores (ADE).....	14
<b>Figura 7.</b> Entrada do vírus nos vasos sangüíneos através da picada do mosquito.....	15
<b>Figura 8.</b> Cascata de citocinas induzida pelo DENV.....	19
<b>Figura 9.</b> Gráfico das diferenças de cinética de expressão dos genes que codificam mediadores inflamatórios.....	21
<b>Figura 10.</b> Esquematização das placas 6-poços de cultura de macrófagos.....	28
<b>Figura 11.</b> Esquematização da extração de RNA.....	30
<b>Figura 12.</b> Concentrações de RNAs extraídos das células RAW 264.7.....	36
<b>Figura 13.</b> Curvas de amplificação e dissociação do gene HPRT.....	39
<b>Figura 14.</b> Curvas de amplificação e dissociação do gene do TNF- $\alpha$ .....	40

<b>Figura 15.</b> Níveis de expressão do gene do TNF- $\alpha$ em células RAW 264.7.....	42
<b>Figura 16.</b> Curvas de amplificação e dissociação do gene do IFN- $\beta$ .....	43
<b>Figura 17.</b> Níveis de expressão do gene do IFN- $\beta$ em células RAW 264.7.....	45
<b>Figura 18.</b> Curvas de amplificação e dissociação do gene da IL-10.....	46
<b>Figura 19.</b> Níveis de expressão do gene da IL-10 em células RAW 264.7.....	48
<b>Figura 20.</b> Curvas de amplificação e dissociação do gene da IL-6	49
<b>Figura 21.</b> Níveis de expressão do gene da IL-6 em células RAW 264.7.....	51
<b>Figura 22.</b> Curvas de amplificação e dissociação do gene da IL-12p40.....	52
<b>Figura 23.</b> Níveis de expressão do gene da IL-12p40 em células RAW 264.7.....	54
<b>Figura 24.</b> Curvas de amplificação e dissociação do gene da NOS2.....	55
<b>Figura 25.</b> Níveis de expressão do gene da NOS2 em células RAW 264.7.....	57

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores murinos utilizados na reação de PCR em tempo real.....	34
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**µl**- Microlitro

**µg**- Micrograma

**ADE**- Anticorpos potencializadores da infecção, do inglês, *Antibody-dependent enhancement*

**APCs**- Células apresentadoras de antígenos, do inglês, *antigen presenting cells*

**AP-61**- Linhagem celular de mosquito *Aedes pseudoscutellaris*

**BR/90**- Número da cepa do vírus da dengue sorotipo 1

**C**- Proteína C nucleocapsídica do vírus da dengue

**CD14**- Receptor de LPS

**CD25**- Cadeia alfa do receptor de interleucina 2, uma proteína transmembrana presente em Linfócitos T e B ativados. Marcador de ativação de linfócitos.

**CD107a**- Marcador de degranulação citotóxica, de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ativados.

**CCL5**- CC-quimiocina ligante-5, do inglês, *Chemokine (C-C motif) ligand 5*

**C6/36**- Linhagem celular de mosquito *Aedes albopictus*

**DENV**- Vírus da dengue, do inglês, *Dengue virus*

**DENV-1**- Vírus da dengue sorotipo 1

**DENV-2**- Vírus da dengue sorotipo 2

**DENV-3**- Vírus da dengue sorotipo 3

**DENV-4**- Vírus da dengue sorotipo 4

**DEPc**- Dietilpolicarbonato

**DHF**- Dengue hemorrágica, do inglês, *Dengue hemorrhagic fever*

**DIVE**- Diretoria de Vigilância Epidemiológica

**DMEM**- Meio Dulbecco Essencial Mínimo, do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

**dNTPs**- Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

**DSS**- Síndrome do choque mediada por dengue, do inglês, *Dengue Shock Syndrome*

**dsRNA**- RNA de fita dupla, do inglês, *Double strand RNA*

**E**- Glicoproteína E do envelope viral

**FcγR**- Receptor da porção Fc de anticorpo IgG

**FoxP3**- Fator de transcrição expresso em células T regulatórias, do inglês, *forkhead box P3*

**GEZOO**- Gerência de Vigilância de Zoonoses



**h**- Hora  
**hCF**- Fator citotóxico humano, do inglês, *Human cytotoxic factor*  
**HCV**- Vírus da hepatite C, do inglês, *Hepatitis C virus*  
**HEPES**- Tampão Ácido Etanosulfônico 4-2 Hidroxietyl Piperazina-1  
**h.p.i.**- Horas pós-infecção  
**HPRT**- Hipoxantina-fosforibosil Transferase, do inglês, *human hypoxanthine phosphoribosyltransferase*  
**IFN- $\alpha$** - Interferon alpha  
**IFN- $\beta$** - Interferon beta  
**IFN- $\gamma$** - Interferon gama  
**IgG-ELISA**- Detecção de IgG específica por ensaio imunoenzimático de captura  
**IgG**- Imunoglobulina gamma  
**IgM**- Imunoglobulina M  
**IL**- Interleucina  
**iRNA**- RNA de interferência  
**ISG**- genes estimulados por interferon, do inglês, *interferon-stimulated genes*  
**KCl**- Cloreto de potássio  
**KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>**- Fosfato monobásico de potássio  
**LAMP1**- Proteína 1 de Membrana Associada ao Lisossomo, do inglês, *Lysosomal-associated membrane protein 1*, mesmo que CD107a  
**LPS**- Lipopolissacarídeo de parede celular de bactérias Gram-negativas  
**M**- Molar  
**MAC-ELISA**- Detecção de IgM específica por ensaio imunoenzimático de captura  
**MDA-5**- gene 5 associado à diferenciação de melanoma, do inglês, *retinoic acid-inducible gene 1*  
**MgCl<sub>2</sub>**- Cloreto de magnésio  
**MHC**- Complexo principal de histocompatibilidade, do inglês, *Major histocompatibility complex*  
**MOI**- Multiplicidade de Infecção, do inglês, *Multiplicity of Infection*  
**mRNA**- RNA mensageiro  
**nm**- Nanômetro  
**NaCl**- Cloreto de Sódio  
**Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>**- Fosfato de sódio dibásico  
**NK**- célula exterminadora natural, do inglês, *Natural Killer*  
**NLRs**- receptores do tipo NOD, do inglês, *NOD-like receptors*  
**NO**- Óxido nítrico, do inglês, *nitric oxide*

**NOD**- Domínio de oligomerização de nucleotídeo, do inglês, *nucleotide oligomerization domain*

**NOS2**- Enzima óxido nítrico sintase induzida, do inglês, *inducible nitric oxide synthase*

**NS**- Proteína não-estrutural do vírus da dengue, do inglês, *non-structural protein*

**ORF**- Janela aberta de leitura, do inglês, *open reading frame*

**PAMPs**- Padrões moleculares associados a patógenos, do inglês, *pathogen-associated molecular patterns*

**PBMCs**- Células mononucleares do sangue periférico, do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*

**PBS**- Tampão salina fosfato, do inglês, *Phosphate buffered saline*

**pmol**- Picomol

**PolyI:C**- ácido poliinosínico:policitidílico, do inglês, *polyinosinic:polycytidylic acid*

**prM**- Glicoproteína precursora da proteína de membrana do vírus da dengue

**RANTES**- Quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T, do inglês, *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted*

**RAW 264.7**- Linhagem celular de macrófagos leucêmicos murinos, do inglês, *Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*

**RIG-I**- gene induzido por ácido retinóico I, do inglês, *retinoic acid-inducible gene I*

**RLRs**- Receptores do tipo RIG-I, do inglês, *RIG-I-like receptors*

**RNA**- Ácido ribonucleico, do inglês, *ribonucleic acid*

**rpm**- Rotações por minuto

**RT-PCR**- Reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase

**SC**- Santa Catarina

**SFB**- Soro Fetal Bovino

**SES**- Secretaria de Estado da Saúde

**SR-As**- Receptores removedores de classe A, do inglês, *class A scavenger receptors*

**ssRNA**- RNA de fita simples, do inglês, *single strand RNA*

**STAT-2**- Transdutor de sinal e ativador de transcrição 2, do inglês, *Signal transducer and activator of transcription 2*

**SVS/MS**- Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde

**T CD4<sup>+</sup>**- Linfócitos T helper

**T CD8<sup>+</sup>**- Linfócitos T citotóxicos

**Th1**- Resposta linfocitária do tipo T helper 1

**Th2**- Resposta linfocitária do tipo T helper 2

**TLR**- Receptor do tipo toll, do inglês, *Toll-like receptor*

**TNF- $\alpha$** - Fator de necrose tumoral alfa, do inglês, *Tumor necrosis factor-alpha*

**TNF- $\beta$** - Fator de necrose tumoral beta, do inglês, *Tumor necrosis factor-beta*

**TRA-284**- Linhagem celular de mosquito *Toxorhynchites amboinensis*

**Treg**- Células T regulatórias

**TRIF**- Adaptador contendo domínio TIR indutor de interferon  $\beta$ , do inglês, *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- $\beta$*

**U/ $\mu$ l**- Unidades por microlitro

**UFF**- Unidade Formadora de Foco

**WHO**- *World Health Organization*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>xi</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1.    Histórico e origem da Dengue .....	1
1.2.    Epidemiologia da dengue no Brasil e no mundo .....	3
1.3.    Ciclo de transmissão da doença .....	4
1.4.    Manifestações clínicas .....	5
1.5.    Diagnóstico .....	7
1.6.    Características genômicas e estruturais do Dengue vírus .....	8
1.7.    Replicação viral.....	10
1.8.    A resposta imune humoral e a ADE.....	12
1.9.    A resposta imune celular contra o DENV .....	14
1.10.   Citocinas envolvidas na Dengue .....	16
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>

2.1.	Objetivos Gerais .....	23
2.2.	Objetivos Específicos .....	23
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>25</b>
3.1.	Cultivo celular .....	25
3.2.	Infecção de macrófagos murinos RAW 264.7 com DENV-1 e DENV-4.....	25
3.3.	Extração de RNA total dos macrófagos murinos RAW 264.7 .....	28
3.4.	Síntese de cDNA por RT-PCR .....	30
3.5.	PCR em tempo real.....	32
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
4.1.	Concentração dos RNAs.....	37
4.2.	Cinéticas de expressão dos genes das citocinas e da enzima NOS2 em macrófagos infectados com os vírus da Dengue sorotipos 1 e 4. ....	38
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>7.</b>	<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>75</b>



# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Histórico e origem da Dengue

A Dengue tem como agente etiológico o *Dengue virus* (DENV), um arbovírus da família *Flaviviridae*, do gênero *Flavivirus*. O *Dengue virus* humano parece ter evoluído como um vírus de primatas não humanos (WANG *et al.*, 2000). Os animais infectados com o *Dengue virus* ancestral possivelmente foram mantidos separados por longos períodos permitindo a evolução dos vírus cujas proteínas do envelope apresentavam diferenças, isso levou à diversificação do vírus e ao surgimento dos quatro diferentes sorotipos do DENV (HALSTEAD, 2008). Evidências genéticas das cepas virais estudadas sugerem que os quatro tipos de vírus silváticos foram introduzidos no ciclo urbano nos últimos mil anos (WANG *et al.*, 2000).

Existem relatos antigos da doença em vários locais do mundo. Na China, por exemplo, existem relatos de doença febril causada por água envenenada em 992 (GUBLER & KUNO, 1997). O vírus da dengue pode ter sido levado para o Novo Mundo em 1600 através da intensa comercialização de escravos africanos (HALSTEAD, 2008). Em 1780, na Filadélfia, nos Estados Unidos, Benjamin Rush observou os pacientes acometidos por uma doença febril e realizou a primeira descrição do quadro clínico da dengue (HALSTEAD, 2008).

O termo “*febre quebra-ossos*” (do espanhol “*quebranta huesos*” e do inglês, “*breakbone fever*”), usado para designar a doença, estava em uso na Espanha por volta de 1780 (RIGAU-PEREZ, 1998). As febres que duravam entre cinco e sete dias que acometeram os colonizadores europeus na Ásia tropical, durante o mesmo período, também foram supostamente causadas pelo vírus da dengue (CAREY, 1971). Um surto febril que ocorreu na costa da Arábia e no Egito, nos anos 1870 e 1873, levou à descoberta de que a palavra do dialeto Suaíli, idioma banto, uma das línguas oficiais do Quênia, para a doença era “*ki-dinga pepo*” (CHRISTIE, 1872 *apud* HALSTEAD, 2008). O termo “*ki-dinga pepo*” foi traduzido como tremor súbito de câimbra causado por espírito do mal. Além disso, num surto febril anterior em 1823, no leste da África, o termo “*dinga*” ou “*dyenga*” foi utilizado para se referir à doença (CHRISTIE, 1872 *apud* HALSTEAD, 2008).

A palavra “dengue” foi também utilizada para se referir à doença que acometeu os integrantes da Corte Espanhola em 1800 (RIGAU-PEREZ, 1998). Este uso pode ter sido proveniente da África,

pois a Espanha mantinha fortes relações de comércio e exploração com o continente africano, de onde se origina o principal vetor da doença, o *Stegomyia aegypti*. A doença parece ter migrado da África para o Caribe em 1827 até chegar a Cuba, através da comercialização de escravos africanos. Em Cuba, a palavra espanhola *dengue* foi utilizada para se referir à doença, e nas Índias Ocidentais Britânicas, a palavra *dandy*. Esses termos indicam o estado fastidioso, apático e doloroso dos pacientes acometidos por esta enfermidade (CHRISTIE, 1872 *apud* HALSTEAD, 2008).

Durante a Segunda Guerra Mundial foram realizados o isolamento e a caracterização do DENV (HALSTEAD, 1992; GUBLER & KUNO, 1997). O vírus foi isolado pela primeira vez a partir de soro humano em 1950, através de passagens seriadas em cérebro de camundongos neonatos, com o objetivo de criar uma vacina atenuada contra o DENV (SABIN & SCHLESINGER, 1945). A falha das cepas em promover a proteção cruzada em voluntários humanos levou à determinação dos tipos 1 (DENV-1) e 2 (DENV-2) do *Dengue virus* (SABIN, 1950). Outros sorotipos do DENV foram isolados durante uma epidemia de dengue hemorrágica na Tailândia e Filipinas e designados dengue tipos 3 (DENV-3) e 4 (DENV-4), respectivamente (HAMMON *et al.*, 1960).

Os relatos mais antigos de casos de dengue no Brasil são do século 19. Em 1917, Mariano (MARIANO, 1917 *apud* FIGUEIREDO, 2003) reportou uma epidemia que ocorria no Rio de Janeiro em 1846. A doença ficou conhecida como *polka* por causa da dança de mesmo nome, uma vez que, as contrações musculares da Dengue, causadas por mialgia e artralgia se pareciam com o ritmo da dança. Os surtos de dengue parecem ter ocorrido também nas regiões nordeste e sul do Brasil durante o século 19 (FIGUEIREDO, 2003). Reis, em 1896 (REIS, 1896 *apud* FIGUEIREDO, 2003), descreveu o quadro clínico dos pacientes acometidos pela dengue durante um surto em Curitiba. Em 1917, Mariano (MARIANO, 1917 *apud* FIGUEIREDO, 2003) relatou um surto de dengue no Rio Grande do Sul. Em 1923, Pedro (PEDRO, 1923 *apud* FIGUEIREDO, 2003) descreveu as manifestações clínicas da doença, de acordo com os dados sobre a epidemia de 1922 a 1923, na cidade do Rio de Janeiro. O primeiro surto no sudeste do país começou no Rio de Janeiro em Março de 1986 (SCHATZMAYR *et al.*, 1986).

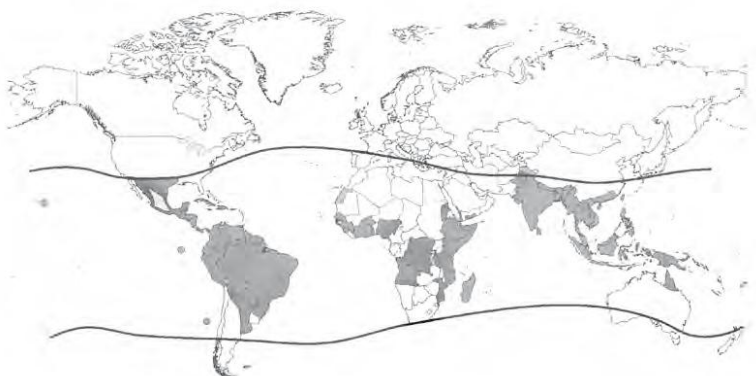


## **1.2. Epidemiologia da dengue no Brasil e no mundo**

A dengue é uma patologia febril que pode se agravar e levar a quadros hemorrágicos, podendo levar ao óbito. Nos últimos 50 anos, a incidência da doença aumentou 30 vezes com o aumento da sua expansão geográfica (Figura 1) (WHO, 2009). Estima-se que 2,5 bilhões de pessoas vivem em mais de 100 países endêmicos, onde a dengue pode ser transmitida (WHO, 2009). Mais de 50 milhões de infecções ocorrem anualmente, sendo 500.000 casos de dengue hemorrágica com 22.000 mortes, principalmente entre crianças (WHO, 2009). Entre 2000 e 2007, ocorreram 925.896 casos da doença no mundo (WHO, 2009).

Entre 2001 e 2007, mais de 30 países da América notificaram um total de 4.332.731 casos de dengue. O número de casos de dengue hemorrágica (DHF) no mesmo período foi de 106.037. O número total de mortes por dengue neste mesmo período foi de 1.299, com uma taxa de fatalidade de casos por dengue hemorrágica de 1,2%. Ainda neste mesmo período, 64,6% de todos os casos de dengue (2.798.601 casos) ocorridos nas Américas foram notificados na sub-região do cone sul, formada por Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai. Destes casos, 6.733 foram de dengue hemorrágica com um total de 500 mortes. Aproximadamente 98,5% destes casos foram notificados pelo Brasil, que também reporta as maiores taxas de casos fatais em relação ao outros países do cone sul (WHO, 2009).

A Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) registrou em 2008, no Brasil, 120.570 casos notificados de dengue, sendo 647 casos confirmados de dengue hemorrágica, dos quais, 48 foram a óbito. De acordo com os dados presentes no Programa de Controle da Dengue da Diretoria de Vigilância Epidemiológica e de Gerência de Vigilância de Zoonoses (SES/DIVE/GEZOO/SC, 2011), em Santa Catarina, em 2011 ocorreram 769 casos suspeitos de dengue, dos quais 130 casos foram confirmados. No mesmo estado, em 2011 foram encontrados 679 focos do mosquito *S. aegypti*, dos quais 557 eram focos em imóveis (SES/DIVE/GEZOO/SC, 2011). Até fevereiro de 2012, haviam ocorrido 52 casos suspeitos de dengue, dos quais 8 foram confirmados, sendo esses casos todos provenientes de outros estados do país (SES/DIVE/GEZOO/SC, 2012).



**Figura 1.** Países endêmicos e áreas de risco de transmissão da dengue em 2008.

Fonte: WHO, 2009.

### 1.3. Ciclo de transmissão da doença

A infecção com o vírus da dengue é transmitida através da picada de um mosquito *Stegomyia spp.* fêmea infectada, uma vez que o vírus está presente em sua saliva (GUBLER, 1998). O *S. aegypti* é um mosquito de tamanho reduzido que apresenta cor branca no dorso e tem tropismo por recipientes de água artificiais comumente encontrados em áreas urbanas das regiões tropicais onde deposita seus ovos (GUBLER, 1998). No Brasil, o vírus é encontrado em quase todas as cidades onde existe o seu principal vetor, a fêmea do mosquito *S. aegypti*. Com relação ao nome da espécie do mosquito transmissor, o nome anterior era *Aedes aegypti* que mudou para *Aedes (Stegomyia) aegypti* e, finalmente se tornou *Stegomyia aegypti* na nova classificação (REINERT & HARBACH, 2005). Outros mosquitos do gênero *Stegomyia*, como *Stegomyia albopicta* e *Aedes (Stegomyia) africanus*, têm sido relacionados como transmissores secundários na Ásia e na África, respectivamente, de acordo com o centro de controle e prevenção de doenças dos Estados Unidos, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, sigla em inglês), 1991.

Recipientes encontrados dentro e ao redor da casa, como caixas de água, vasos de flores, pneus velhos, baldes e outros objetos que acumulam a água da chuva são exemplos de locais preferidos para a deposição de ovos e crescimento de larvas. Os mosquitos adultos são raramente notados, uma vez que preferem permanecer em locais fechados e cobertos e se alimentar de sangue humano durante a luz do dia de modo geralmente discreto e indetectável (GUBLER, 1998). O hospedeiro humano apresenta viremia após um período de incubação de 3 a 14 dias, concomitante ao início do período febril (GUBLER, 1998; FIELDS *et al.*, 2007).

Se uma fêmea do mosquito não estiver infectada e picar uma pessoa doente durante a fase de viremia, ela pode se infectar. Consequentemente ela pode transmitir o vírus para outras pessoas não-infectadas após um período de incubação extrínseco do vírus, isto é, incubação do vírus fora de um corpo humano. Esse período de incubação no corpo do mosquito dura de 7 a 12 dias após a infecção (WATTS *et al.*, 1987). O período de incubação é necessário para que ocorra a replicação, disseminação viral na hemocele e disseminação viral por todos os tecidos do mosquito, até chegar às glândulas salivares, a partir das quais o DENV pode ser transmitido para o hospedeiro humano. O mosquito permanece infectado e assintomático durante toda sua vida, sendo capaz de transmitir o vírus da dengue para diversas pessoas, devido à sua capacidade de se alimentar do sangue de vários indivíduos em sequência (GUBLER, 1998). Existe ainda outro tipo importante de transmissão viral entre os mosquitos do gênero *Aedes*, é a transmissão transovariana (JOSHI *et al.*, 2002). Neste tipo de transmissão, o vírus da dengue é transmitido diretamente para a prole, portanto, o homem não é indispensável para manter o ciclo.

#### **1.4. Manifestações clínicas**

A febre clássica da dengue desencadeia dentre os sintomas principais febre alta, cefaléia, mialgia, exantema e intensas dores retro-orbitais (GUZMAN *et al.*, 2010). No início da doença a pele é coberta com petéquias que aparecem na fase “crítica”, e, à medida que o paciente convalesce, são observadas erupções maculares. A fase crítica ocorre em torno de 3 a 7 dias e está associada com um aumento da propensão ao extravasamento do plasma e hemorragia. A DHF, por sua vez, é caracterizada por quadros de trombocitopenia, plaquetopenia,

hemoconcentração e outros indícios de extravasamento do plasma (GUZMAN *et al.*, 2010). A fadiga incapacitante e depressão podem complicar a recuperação (SEET *et al.*, 2007).

Em alguns indivíduos, a permeabilidade capilar se manifesta como um aumento de hematócrito (que é a porcentagem ocupada pelos glóbulos vermelhos ou hemácias no volume total de sangue), derrame pleural ou ascite (retenção de líquido no abdômen) (WHO, 2009). Este é o estágio no qual surgem as complicações clínicas que ameaçam a vida, como a síndrome do choque por dengue (DSS) (GUZMAN *et al.*, 2010).

Características atípicas da dengue estão sendo mais frequentemente reportadas, mas ainda são subestimadas (GULATI & MAHESHWARI, 2007). Essas incluem encefalite, miocardite, hepatite, pancreatite, retinite e a síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS, do inglês *Acute Respiratory Distress Syndrome*) (SEN *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2007; CHIEN *et al.*, 2008). Estas condições atípicas parecem refletir a patologia em diferentes superfícies endoteliais (GULATI & MAHESHWARI, 2007). O reconhecimento dos sinais de alerta que podem indicar a progressão da doença para um quadro grave é essencial para o sucesso do tratamento do caso. Estes sinais incluem dor abdominal, hepatomegalia, evidência de retenção de líquido e aumento de hematócrito (ou queda na dosagem do hematócrito que possa indicar uma possível hemorragia) (WHO, 2009).

Nos quadros clínicos mais brandos, não é necessária a internação hospitalar, entretanto devido às fortes dores musculares, e à fadiga incapacitante o indivíduo torna-se incapaz de desempenhar suas atividades diárias. Portanto, a doença poderia prejudicar as atividades econômicas. Nos casos mais graves, a DHF leva à DSS, que pode levar ao óbito (GUZMAN *et al.*, 2010).

## 1.5. Diagnóstico

O diagnóstico para confirmar as infecções por DENV pode ser feito por isolamento viral a partir do sangue de pacientes até 5 dias após o início da febre. A transcrição reversa seguida de uma reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) utilizando iniciadores específicos para cada sorotipo e a análise do fragmento amplificado em gel de agarose (DEUBEL *et al.*, 1990) é uma técnica que tem sido utilizada para o diagnóstico rápido de infecções pelo vírus da dengue (LANCIOTTI *et al.*, 1992). A técnica RT-PCR em tempo real é utilizada para o diagnóstico da infecção por DENV (SHU *et al.*, 2003; CHIEN *et al.*, 2006; GOMES-RUIZ *et al.*, 2006). Além disso, as seguintes linhagens celulares de mosquitos, *Stegomyia albopicta* (C6/36), *Toxorhynchites amboinensis* (TRA-284) e *Aedes (Stegomyia) pseudoscutellaris* (AP-61) são bastante utilizadas para o isolamento viral (KUNO *et al.*, 1985). Após o isolamento, os vírus podem ser identificados e sorotipados, através de ensaios de imunofluorescência com anticorpos monoclonais específicos para cada sorotipo.

O diagnóstico sorológico é normalmente feito por detecção de IgM específica por ensaio imunoenzimático de captura (MAC-ELISA) (NAWA *et al.*, 2001). A IgM aparece logo depois que a febre termina, por volta do quinto dia após a infecção e os níveis dessa imunoglobulina começam a diminuir de 30 a 60 dias após o início da infecção (GUZMAN & KOURI, 1996). Os métodos sorológicos clássicos podem também ser utilizados dependendo do aumento da titulação de anticorpos detectados por inibição da hemaglutinina (HAI, do inglês *hemagglutination inhibition assay*) (VAUGHN *et al.*, 1999), fixação de complemento (CFA, do inglês *complement fixation assay*), ou neutralização (NTA, do inglês *neutralization assay*) (GUZMÁN & KOURÍ, 2004). Devido à associação entre as infecções secundárias com diferentes sorotipos e DHF/DSS, é importante distinguir o sorotipo presente numa infecção primária e o sorotipo de uma infecção secundária. Para diferenciar os sorotipos de uma infecção primária e de uma infecção secundária utiliza-se principalmente a técnica HAI (VAUGHN *et al.*, 1999).

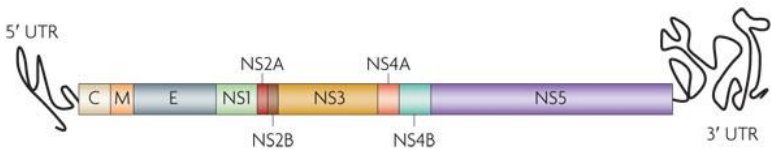
De acordo com o Guia de Vigilância Epidemiológica da Dengue da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2009), no Brasil os principais métodos diagnósticos utilizados são a detecção de IgM específica por MAC-ELISA, a detecção de IgG por

IgG-ELISA, o isolamento viral e a detecção de antígeno NS1 por ELISA. A RT-PCR em tempo real, apesar de não ser uma técnica diagnóstica de rotina, é utilizada quando as demais técnicas de rotina forem insuficientes para a definição diagnóstica.

### **1.6. Características genômicas e estruturais do Dengue vírus**

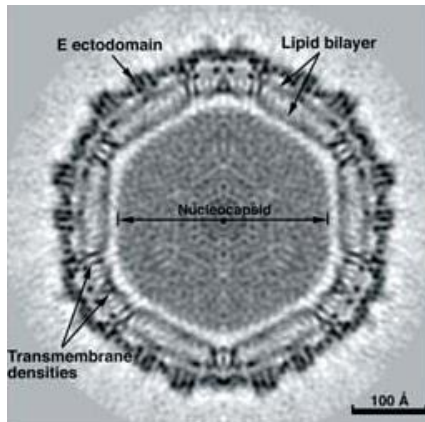
O DENV é um vírus envelopado que tem o genoma de RNA fita simples, senso positivo com aproximadamente 11 kb que forma uma única janela aberta de leitura (ORF, do inglês *open reading frame*) ininterrupta de 10.173 nucleotídeos que é traduzida num precursor de uma poliproteína de 3.391 aminoácidos, com aproximadamente 370 kDa (NATARAJAN, 2010). Nas extremidades 5' e 3' do genoma encontram-se regiões não-traduzidas de 96 e 454 nucleotídeos, respectivamente, que são importantes para o controle da replicação do RNA viral (CLYDE *et al.*, 2006). Os vírions são partículas esféricas de 40 a 50 nm de diâmetro e têm envelope lipídico derivado das membranas das células hospedeiras. A poliproteína é clivada durante e após a tradução pelas proteases celulares do hospedeiro e pela protease viral NS3 e forma as três seguintes proteínas estruturais: C (proteína C nucleocapsídica, constitui o capsídeo viral, com 12-14 kDa), prM ou M (proteína precursora da proteína de membrana, com 8 kDa) e a glicoproteína E (proteína homodimérica do envelope viral, com 51-49 kDa), além de sete proteínas não- estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) envolvidas no processo de replicação e maturação viral (HENCHAL & PUTNAK, 1990; KAUTNER *et al.*, 1997).

A ordem das proteínas precursoras traduzidas a partir da única janela aberta de leitura é: C-prM-E-NS1-NS2-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5 (Figura 2). O envelope viral consiste de uma bicamada lipídica ao redor do capsídeo que contém 10,7 kb da fita senso positivo do genoma de RNA (LINDENBACH & RICE, 2003). Como mencionado anteriormente, a poliproteína é clivada co- e pós-traducionalmente, sendo que uma peptidase sinal do hospedeiro realiza as clivagens entre C/prM, prM/E, E/NS1, e próxima da região carboxiterminal da NS4A. A serina protease, codificada pelo próprio vírus realiza as clivagens entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5 (LINDENBACH & RICE, 2003).



**Figura 2.** Estrutura do genoma do vírus da dengue.  
Fonte: GUZMAN *et al.*, 2010.

O genoma viral do DENV é encapsulado pela proteína C do nucleocapsídeo, formando uma estrutura icosaédrica (ZHANG *et al.*, 2003) (Figura 3).

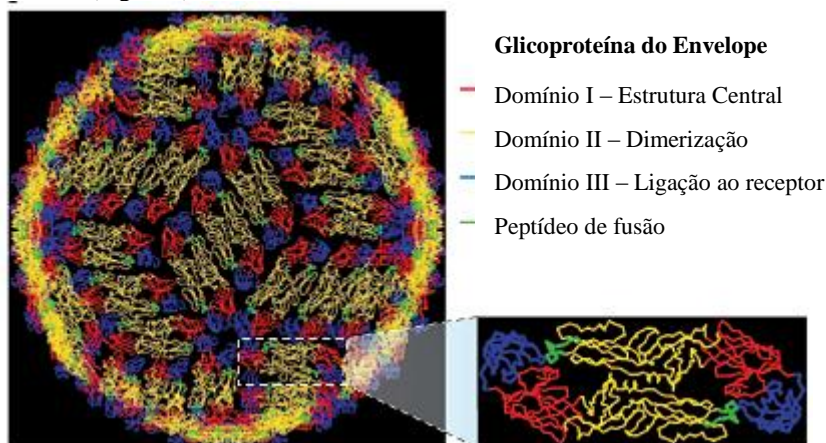


**Figura 3.** Organização estrutural do DENV. Foi feito um corte longitudinal do *vírion* que demonstra o formato icosaédrico do nucleocapsídeo. Nesta visualização de microscopia eletrônica de criofratura, quanto mais escura a estrutura, maior a sua densidade.  
Fonte: Zhang *et al.*, 2003.

A glicoproteína E do envelope do DENV interage com receptores de superfície da célula, estando relacionada com a fusão, em pH ácido, com a membrana do endossomo da célula hospedeira. Dessa forma tem caráter antigênico e é responsável pela neutralização de anticorpos (LINDENBACH & RICE, 2003).

A glicoproteína E consiste de um dímero, em que cada monômero é composto por três domínios folhas  $\beta$ : um domínio central (I), um domínio de fusão/dimerização (domínio II) e um domínio envolvido na ligação com o receptor da célula hospedeira (domínio III) (WHITEHEAD *et al.*, 2007). O

arranjo do ectodomínio na partícula viral madura está na forma de três dímeros paralelos (Figura 4).



**Figura 4.** Estrutura do ectodomínio da proteína de envelope na partícula madura do vírus da dengue. O ectodomínio é formado por 3 dímeros paralelos. O peptídeo de fusão é mostrado na cor verde. Os domínios I, II e III da proteína E estão representados nas cores vermelho, amarelo e azul, respectivamente.

Fonte: WHITEHEAD *et al.*, 2007.

## 1.7. Replicação viral

O *Dengue virus* tem tropismo por células do sistema mononuclear fagocitário, macrófagos, monócitos e linfócitos B (LIN *et al.*, 2002), nas quais se replica, ocorrendo ainda infecção de mastócitos, células dendríticas e células endoteliais (AVIRUTNAN *et al.*, 1998; HUANG *et al.*, 2000; MALAVIGE *et al.*, 2004; JAIYEN *et al.*, 2009; BROWN *et al.*, 2011; ROTHMAN, 2011). A entrada viral ocorre por endocitose, com a fusão das membranas lipídicas do envelope viral com as membranas lipídicas do hospedeiro (BRESSANELLI *et al.*, 2004; MODIS *et al.*, 2004). O capsídeo entra no citoplasma da célula, em seguida, ocorre acidificação do endossomo e a liberação do genoma viral de RNA no citoplasma da célula hospedeira (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005).

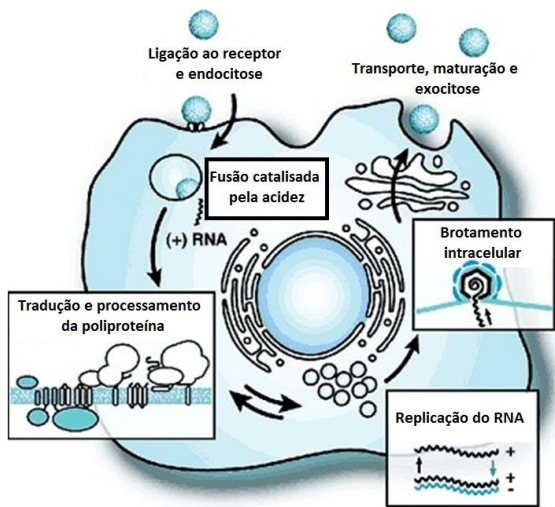
Primeiramente, ocorre a tradução e o processamento das proteínas virais não-estruturais, que, por sua vez, auxiliam o processo de transcrição. Assim, o RNA senso positivo é transcrito, a partir da



extremidade 3', numa fita de RNA senso negativo, ou seja, numa de fita RNA mensageiro (mRNA), que é em seguida, transcrita de volta numa fita senso positivo, através da enzima RNA polimerase RNA-dependente do vírus (do inglês, *RNA-dependent RNA polymerase* (RdRp)) (BARTHOLOMEUSZ & THOMPSON, 1999; YOU *et al.*, 2001; NOMAGUCHI *et al.*, 2003). As fitas resultantes de RNAs senso positivo formam os RNAs da progênie.

A montagem do *virion* acontece na superfície do retículo endoplasmático (RE), em associação com suas membranas, em seguida, o RNA recém-sintetizado e os nucleocapsídeos montados brotam dentro do *lúmen* do RE e as partículas virais são liberadas por exocitose (FIELDS *et al.*, 2007) (Figura 5). As partículas virais imaturas são transportadas através da rede trans-Golgi, onde elas são maturadas e convertidas na forma infecciosa (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005). Os vírus maduros são então liberados da célula e podem infectar outras células.

Assim como todos os vírus de genoma RNA, os DENVs apresentam altas taxas de mutações, uma vez que, não possuem mecanismos de reparo de erros de replicação (*proofreading*) realizados pela RNA polimerase viral (HOLLAND *et al.*, 1982). Esta alta taxa de mutação do DENV seria o fator determinante da alta variabilidade genética observada neste vírus, porém, outros estudos mais recentes mostraram que a recombinação gênica também seria responsável pela diversidade genética dos DENV (HOLMES & TWIDDY, 2003).



**Figura 5.** Esquema do ciclo de vida do vírus da dengue no citoplasma.

Fonte: Adaptado de FIELDS *et al.*, 2007.

### 1.8. A resposta imune humoral e a ADE

O vírus da dengue é classificado em quatro diferentes sorotipos (DENV 1, 2, 3 e 4) (LINDENBACH & RICE, 2003). Um sorotipo pode ser mais comum em um determinado território, por exemplo, os sorotipos prevalentes na Ásia são diferentes daqueles na América (HALSTEAD, 2006). A infecção por um dos sorotipos do vírus da dengue confere imunidade somente para aquele sorotipo específico. Portanto, os indivíduos podem desenvolver a doença toda vez que forem infectados por sorotipos diferentes.

Anticorpos resultantes de uma infecção primária por um sorotipo viral podem promover uma reação cruzada e podem não neutralizar um sorotipo viral diferente numa infecção secundária, dessa forma, esses anticorpos se ligam ao vírus aumentando o potencial do vírus em infectar as células que possuem receptores para a região Fc destes anticorpos, como monócitos, macrófagos e células dendríticas. Esses anticorpos são chamados de anticorpos não-neutralizantes (HALSTEAD *et al.*, 2010).

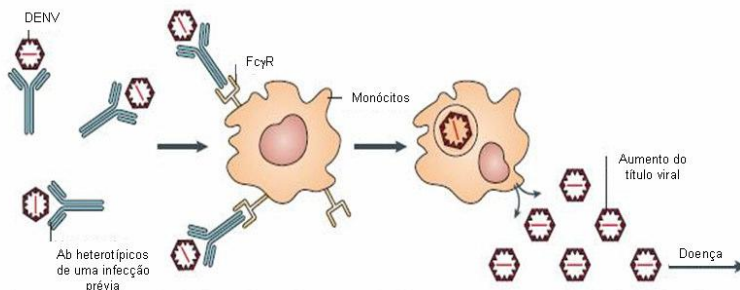
Algumas evidências sugerem que células infectadas através da ADE são imunologicamente moduladas de modo que o ambiente

intracelular se torna mais permissivo à replicação viral. Células da linhagem monócito-macrófago parecem ser os sítios de replicação do DENV mais comuns sob as condições da ADE (HALSTEAD *et al.*, 2010). O conceito da ADE foi inicialmente proposto em 1977 (HALSTEAD & OROURKE, 1977). A ADE foi suportada pelos dados epidemiológicos de Cuba de 1981 e de 1997, os quais demonstraram que a DHF foi mais frequentemente observada nos pacientes que possuíam evidências de infecção prévia por outro sorotipo do DENV (GUZMAN *et al.*, 1999). Uma pesquisa que confirma a ADE demonstrou que anticorpos contra a proteína estrutural precursora de membrana (prM) do DENV, componentes da resposta humoral contra a infecção, são altamente reativos com outros sorotipos do DENV, levando a reações cruzadas (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2010).

Estudos *in vitro* indicam que mesmo quando anticorpos anti-prM estão em altas concentrações, são não-neutralizantes, mas medeiam fortemente a ADE nos receptores Fc das células que os possuem (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2010; RODENHUIS-ZYBERT *et al.*, 2010). A replicação viral dependente de anticorpos potencializadores da infecção ocorre quando esses anticorpos não-neutralizantes heterotípicos já presentes no hospedeiro, decorrentes de uma infecção primária com o DENV, se ligam a uma partícula infecciosa viral durante uma infecção heterotípica subsequente e não são capazes de neutralizar o vírus. Ao invés disso, o complexo anticorpo-vírus se liga pela região Fc do anticorpo aos receptores Fcγ (FcγR) presentes em monócitos circulantes, facilitando, portanto, a infecção de células que possuem este tipo de receptor no corpo ainda não infectado na ausência de anticorpo (Figura 6). O resultado geral é um aumento na replicação viral geral, levando a um quadro clínico mais grave da doença (WHITEHEAD *et al.*, 2007).

A base proposta para a ADE mediada por prM é que em uma proporção de partículas virais, a prM é parcialmente clivada da superfície viral apenas durante o processo de maturação viral. Portanto, as partículas virais imaturas que seriam pouco infecciosas ou não-infecciosas, se tornam infecciosas num ambiente onde os anticorpos anti-prM podem mediar a ADE (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2010).

Devido à ADE torna-se difícil desenvolver vacinas com anticorpos que sejam efetivamente neutralizantes e que não potencializem a infecção por qualquer um dos sorotipos do DENV.



**Figura 6.** Esquema da amplificação da infecção através dos anticorpos potencializadores (ADE).

Fonte: Adaptado de WHITEHEAD *et al.*, 2007.

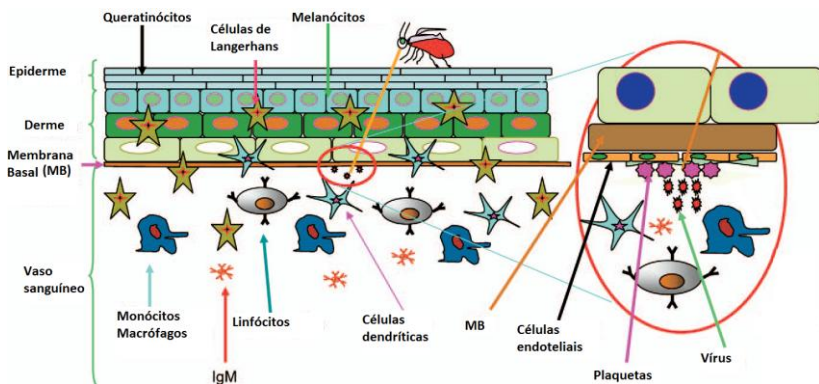
### 1.9. A resposta imune celular contra o DENV

As células dendríticas são as primeiras células imunes presentes e ativadas nos períodos iniciais da infecção. Outros tipos celulares também entram em contato com o vírus e quando ativados liberam citocinas com o objetivo de combater a infecção (NOISAKRAN & PERNG, 2008; NOISAKRAN *et al.*, 2010) (Figura 7). As respostas imunes celulares têm um papel muito importante na eliminação da infecção viral e na indução do agravamento do quadro clínico da doença. Os linfócitos T de memória ativados reconhecem ambos os epítomos conservados ou alterados dos peptídeos presentes na superfície de células infectadas e relacionados ao extravasamento do plasma (ROTHMAN & ENNIS, 1999). Além disso, a expressão desses epítomos virais na superfície de células infectadas induz a proliferação de linfócitos T de memória e a produção de citocinas pró-inflamatórias que têm um efeito indireto nas células endoteliais levando ao extravasamento do plasma. A potencialização da infecção e o agravamento da doença estão relacionados ao nível de resposta dos linfócitos T (ZIVNA *et al.*, 2002; MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003).

Os linfócitos T de pacientes com DHF/DSS na fase aguda apresentaram perfil altamente ativado e apoptótico (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003). Linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> específicos para o DENV, após interação com células apresentadoras de antígenos infectadas, produzem altos níveis de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ , além de quimiocinas (GAGNON *et al.*, 1999).

As células T na infecção grave por DENV têm uma afinidade reduzida pelo sorotipo infectante, mas uma alta afinidade por um sorotipo diferente de uma infecção anterior (MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2003). As respostas de células T em pacientes com quadro grave da doença envolvem principalmente a produção de IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  e raramente a produção de CD107a, um marcador de degranulação citotóxica, também conhecido como LAMP1. Em pacientes com dengue branda, muitas células T CD8<sup>+</sup> expressam CD107a e poucas expressam apenas IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  (DUANGCHINDA *et al.*, 2010). Isso retarda a limpeza viral, e através da via das citocinas e os efeitos decorrentes, aumenta potencialmente o risco de manifestação grave da doença. Outros autores demonstraram que as células T são funcionais, que se expandem na infecção aguda por DENV e que podem ter um papel na supressão da produção de citocinas vasoativas (LUHN *et al.*, 2007).

As células NK que expressam precocemente marcadores de ativação, citotoxicidade e moléculas de adesão em pacientes com DF estão relacionadas a um bom prognóstico da doença (AZEREDO *et al.*, 2006).



**Figura 7.** Entrada do vírus nos vasos sanguíneos através da picada do mosquito. Células dendríticas, macrófagos e linfócitos são recrutados para o sítio da infecção a fim de combatê-la.

Fonte: Adaptado de NOISAKRAN & PERNG, 2008.

Outros tipos celulares infectados também são ativados e produzem citocinas. A infecção de células dendríticas de origem mielóide pelo DENV induz a produção de TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  por estas células. O DENV, na presença de IFN- $\gamma$ , induz as células dendríticas de

origem mielóide a secretarem IL-12p70, mas não induz a secreção de IL-10 (LIBRATY *et al.*, 2001). Outras pesquisas mostraram que células dendríticas periféricas produzem 10 vezes mais TNF- $\alpha$  e IFN- $\alpha$  do que as células dendríticas mielóides (SUN *et al.*, 2009). Essa diferença se deve às diferenças nas características dessas células. Sabe-se que as células dendríticas periféricas são capazes de produzir IFN tipo I 100 a 1000 vezes mais do que os outros tipos celulares do sangue (SIEGAL *et al.*, 1999).

Outros autores sugerem que os mastócitos representam uma importante fonte de TNF, promovendo perturbações endoteliais seguida de uma potencialização da infecção por DENV através da ADE (BROWN *et al.*, 2011). Além disso, foi observado que mastócitos infectados com o DENV produzem também quimiocinas como RANTES (ou CCL5), MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , que atraem células T (KING *et al.*, 2002). Outros achados demonstraram que células endoteliais infectadas com o DENV secretam grandes quantidades de IL-8, RANTES (AVIRUTNAN *et al.*, 1998) e IL-6, mas não IL-1 $\beta$  (HUANG *et al.*, 2000).

### **1.10. Citocinas envolvidas na Dengue**

A ativação das células de memória por uma re-infecção por sorotipo viral diferente e a grande carga viral induz a expressão de uma cascata de ativação celular e liberação de citocinas e outras moléculas inflamatórias de linfócitos T inatos e ativados (PANG *et al.*, 2007). A formação de imunocomplexos durante a interação com as células apresentadoras de antígenos (APCs) (monócitos, macrófagos e células dendríticas) infectadas levaria à ativação de linfócitos T em larga escala. Como foi visto, o imunocomplexo vírus-anticorpo não-neutralizante se liga ao receptor Fc (Fc $\gamma$ R) para IgG na superfície dos monócitos, facilitando a entrada do DENV na célula, levando à ativação exacerbada de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (KURANE & ENNIS, 1994; LIBRATY *et al.*, 2002).

Atualmente, as células T regulatórias TCD4<sup>+</sup> CD25 (high) FoxP3<sup>+</sup> (Treg) têm sido estudadas em casos clínicos de gravidades diferentes. Os resultados sugerem que pacientes com doença leve teriam maiores taxas de células T regulatórias, quando comparados com os casos graves. Assim, as células Treg seriam capazes de promover a redução da produção de citocinas vasoativas estimuladas por infecção aguda pelo vírus da dengue (LUHN *et al.*, 2007).

Níveis altos de diferentes citocinas foram observados na infecção por DENV (BASU & CHATURVEDI, 2008). As citocinas desempenham um papel sinérgico na superfície endotelial, contribuindo para o extravasamento do plasma (ANDERSON *et al.*, 1997). Sabe-se que após a infecção pelo DENV *in vitro*, os macrófagos, após o reconhecimento do vírus, liberam TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 fator ativador de plaquetas e histaminas (CHATURVEDI *et al.*, 2006). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> ativados passam a produzir altos níveis de IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-6 e TNF- $\alpha$  que podem induzir o extravasamento de plasma por múltiplos efeitos sobre o endotélio vascular, com envolvimento do sistema complemento, bem como pela ativação de monócitos, linfócitos e plaquetas (MCBRIDE & BIELEFELDT-OHMANN, 2000; MANGADA *et al.*, 2002; MONGKOLSAPAYA *et al.*, 2006).

Dentre as citocinas pró-inflamatórias encontradas em altos níveis *in vivo* e *in vitro* em células infectadas com o DENV ou no soro de pacientes com DF/DHF, destaca-se o TNF- $\alpha$ , que promove o aumento da permeabilidade vascular e pode estar relacionado com a evolução da doença para o quadro hemorrágico e o choque hipovolêmico (VITARANA *et al.*, 1991; KUNO & BAILEY, 1994; KUBELKA *et al.*, 1995; ANDERSON *et al.*, 1997; PINTO *et al.*, 1999; BRAGA *et al.*, 2001; NGUYEN *et al.*, 2004; CHAKRAVARTI & KUMARIA, 2006).

Outros autores detectaram também, além de TNF- $\alpha$ , altas concentrações de IFN- $\gamma$  e IL-10 em soro de pacientes com DF e DHF em Cuba, Vietnã, e Índia (PEREZ *et al.*, 2004; HUNG *et al.*, 2005; CHAKRAVARTI & KUMARIA, 2006). Outros estudos demonstraram que o IFN- $\gamma$  potencializa a ativação das células dendríticas infectadas pelo DENV (LIBRATY *et al.*, 2001). Os níveis altos de IL-10 estão associados à redução dos níveis de plaquetas, redução da função plaquetária e desenvolvimento das complicações hemorrágicas (LIBRATY *et al.*, 2002). Além disso, outros resultados mostraram que a IL-10 possui papel imunomodulador e pode ser capaz de inibir a função apresentadora de células dendríticas infectadas com o DENV (PALMER *et al.*, 2005).

Os níveis elevados de IL-6 foram observados em pacientes com DHF/DSS e podem estar relacionados com a ativação da via extrínseca de coagulação e com a gravidade do quadro hemorrágico da dengue (JUFFRIE *et al.*, 2001; AVILA-AGUERO *et al.*, 2004; NGUYEN *et al.*, 2004; CHEN *et al.*, 2006).

O IFN- $\alpha$  é uma citocina que induz resistência aos vírus por ativar vias intracelulares não citolíticas que limitam a dispersão viral e atenuam a infecção (GRANDVAUX *et al.*, 2002). Algumas pesquisas demonstraram que o IFN- $\alpha$  e o IFN- $\beta$  podem proteger as células contra a infecção pelo DENV *in vitro* (DIAMOND *et al.*, 2000). Foi também observado por outros autores que o IFN- $\alpha$  limita a replicação do vírus da dengue no sistema nervoso central de camundongos (SHRESTA *et al.*, 2004). Por outro lado, outros autores mostraram que o DENV inibe a ação do IFN- $\alpha$  e não do IFN- $\gamma$ , através da redução da expressão do transdutor de sinal e ativador de transcrição 2 (STAT-2) (HO *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2005). Além disso, sabe-se que a proteína não-estrutural 4B do vírus, NS4B, inibe a expressão dos elementos de resposta ao estímulo pelo interferon (ISRE, do inglês, *interferon stimulated response elements*) e que a co-expressão de NS4A e NS4B aumenta essa inibição (MUNOZ-JORDAN *et al.*, 2005).

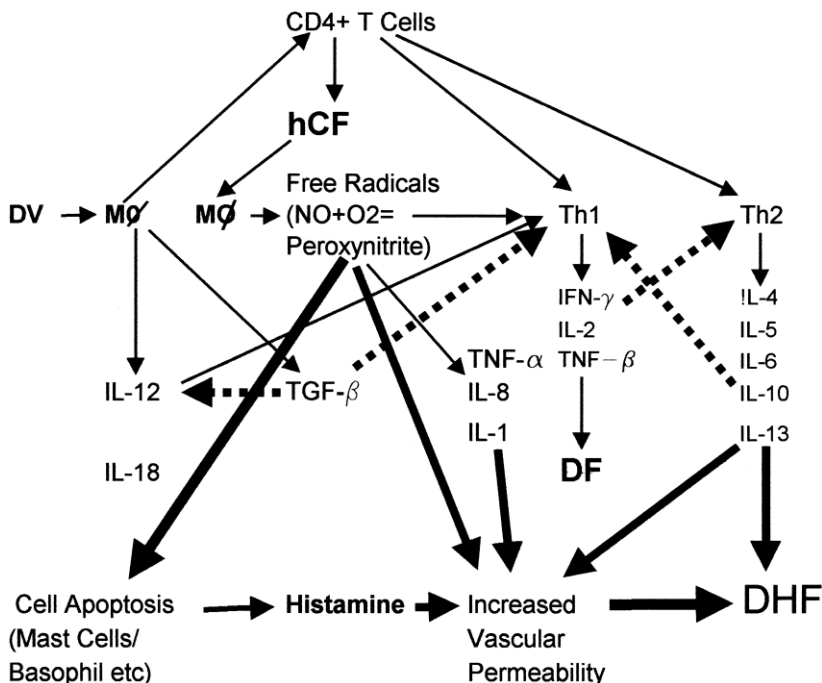
Outros mediadores da resposta inflamatória foram encontrados em pacientes com infecção aguda pelo DENV, como por exemplo, a enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2, do inglês, *inducible nitric oxide synthase*). Também foi demonstrado que o DENV-1 foi suscetível ao óxido nítrico produzido pelos monócitos humanos infectados (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). Outros autores descreveram ainda, níveis reduzidos de óxido nítrico (NO) relacionados com o aumento dos níveis de IL-10 em pacientes com dengue grave (SIMMONS *et al.*, 2007). Esses resultados contribuem para um papel protetor do óxido nítrico, sendo esse mediador associado com quadros clínicos brandos de DF (VALERO *et al.*, 2002).

Em caso de infecção por DENV, as primeiras citocinas a terem os níveis aumentados são o fator citotóxico humano (hCF), IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , enquanto que os genes de citocinas expressados tardiamente são os da IL-4, IL-5 e IL-10. Os níveis de TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  foram mais altos em casos de DHF se comparados com quadros clínicos de dengue clássica. Uma explicação para a associação dessas citocinas com a DHF diz respeito à mudança da resposta de tipo Th1 na dengue clássica para Th2 na DHF com aumento dos níveis de IL-10 e IL-4 (CHATURVEDI *et al.*, 1999; CHATURVEDI *et al.*, 2006).

As respostas de expressão de IL-6 e IL-10 são do tipo Th2 (Figura 8) (CHATURVEDI *et al.*, 2000). A IL-12, por sua vez, tem um efeito profundo sobre a regulação positiva de células Th1 e de citocinas derivadas de uma resposta do tipo Th1 (Figura 8). Na ausência da IL-12



o equilíbrio é deslocado para uma resposta do tipo Th2. A IL-12 tem sido associada com a limpeza do vírus, recuperação do hospedeiro e proteção em um grande número de infecções virais (CHATURVEDI *et al.*, 2000). Todas essas observações demonstram o importante papel das citocinas e mediadores químicos na exacerbação da cascata de citocinas inflamatórias na dengue (MCBRIDE & BIELEFELDT-OHMANN, 2000; STEPHENSON, 2005).



**Figura 8.** Cascata de citocinas induzida pelo DENV. O DENV se replica no macrófago e é apresentado para recrutar células CD4<sup>+</sup> que produzem hCF. hCF induz uma cascata de citocinas que pode levar a uma resposta do tipo Th1, causando uma doença mais branda, a DF, ou uma resposta do tipo Th2 resultando em vários graus de severidade da doença, a DHF. Linha fina, indução positiva; linha interrompida, inibição; linha grossa, efeito danoso.

Fonte: CHATURVEDI *et al.*, 2000.

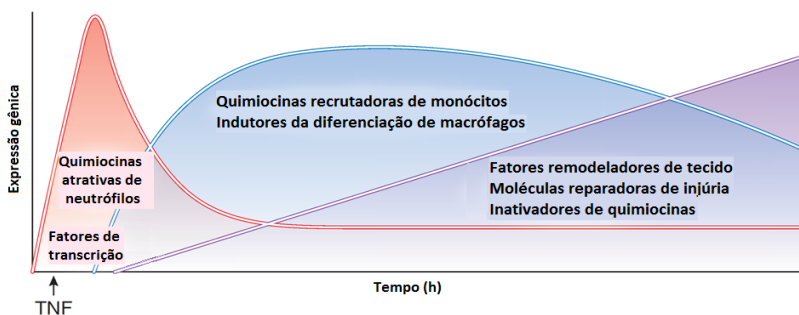
Fatores genéticos individuais e de populações foram vistos com diferentes níveis de susceptibilidade às doenças. A expressão de genes inflamatórios incluindo IFN-γ e IL-12A foi demonstrada em crianças

com infecção grave por dengue, e, o perfil de receptores do tipo Toll (do inglês, “*Toll-like receptors*”) foi diferentemente ativado, ocorrendo um aumento da expressão de TLR7 e TL4R3, ambos incrementando a resposta anti-viral em associação com o extravasamento do plasma e hemorragias (DE KRUIF *et al.*, 2008).

O estudo das citocinas envolvidas no desenvolvimento do quadro clínico da dengue torna-se essencial para o entendimento dos mecanismos de ativação de macrófagos e linfócitos, e consequentemente, para o desenvolvimento de um mecanismo de bloqueio destas vias de mediadores químicos, que possa evitar a evolução da doença clássica para a DHF.

Autores como Hao e Baltimore (2009) e Tullai e colaboradores (2007), demonstraram a importância do estudo da expressão de grupos de genes envolvidos na resposta inflamatória em ordem temporal. Eles demonstraram ainda a classificação dos genes segundo a ordem temporal de expressão: genes de expressão precoce, intermediária e tardia (TULLAI *et al.*, 2007; HAO & BALTIMORE, 2009). Esses estudos são essenciais para o entendimento da cinética de expressão dos genes e da sua relação com a ordem dos eventos inflamatórios decorrentes de uma infecção por algum tipo de patógeno ou estímulo por algum outro indutor.

Os autores Hao e Baltimore (2009) sugeriram que a estabilidade do mRNA e o controle transcricional regulam a cinética de expressão de genes ativados por citocinas. Esses mesmos autores observaram que a maioria dos genes ativados por TNF em macrófagos murinos e em fibroblastos murinos (3T3) apresentou cinética de expressão semelhante. Além disso, observaram que a cinética de expressão desses mesmos genes, quando ativados por LPS, foi semelhante em macrófagos murinos. No caso do estímulo com TNF, eles observaram que os genes de expressão precoce relacionados à liberação de quimiocinas atrativas de neutrófilos e de fatores de transcrição apresentaram um pico em meia hora após o estímulo. Os genes de expressão intermediária relacionados à liberação de quimiocinas recrutadoras de monócitos e indutores da diferenciação de macrófagos apresentaram pico de expressão em 2 horas após o estímulo. Os genes de expressão tardia relacionados à liberação de fatores remodeladores de tecido, moléculas reparadoras de injúria e inativadores de quimiocinas apresentaram pico de expressão em 12 horas após o estímulo com o TNF (HAO & BALTIMORE, 2009) (Figura 9).



**Figura 9.** Gráfico das diferenças de cinética de expressão dos genes que codificam mediadores inflamatórios. Em resposta ao TNF, fibroblastos e macrófagos transcrevem mRNAs que codificam proteínas que regulam a iniciação, propagação e resolução da inflamação. Estes transcritos estão em 3 diferentes classes que diferem quanto á cinética de indução: aqueles de classe I (em vermelho) são expressados precocemente e desaparecem rapidamente; aqueles de classe II (em azul) são expressados intermediariamente e desaparecem lentamente; e aqueles de classe III (em roxo) são expressados tardiamente e persistem.

Fonte: Adaptado de ANDERSON, 2009.

A partir dos estudos de Hao e Baltimore (2009), foi elaborada a hipótese de que a expressão dos genes das citocinas envolvidas na resposta inflamatória contra o DENV tem o mesmo padrão de cinética de quando induzida por LPS.

O presente trabalho visa estudar a dinâmica de expressão das principais citocinas inflamatórias liberadas na resposta de macrófagos murinos à infecção pelo DENV-1 e pelo DENV-4. O entendimento desta cinética torna-se um conhecimento importante, por exemplo, para a produção de fármacos que possam interferir na ativação dos genes destas citocinas, na liberação ou função destes mediadores químicos em tempos específicos após a infecção pelo DENV.



## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Este Trabalho de Conclusão de Curso teve como objetivo o estudo da cinética de expressão dos genes de citocinas inflamatórias envolvidas na resposta de macrófagos à infecção por *Dengue virus*.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- I. Infectar macrófagos murinos RAW 264.7 com o DENV-1, cepa BR/90 e DENV-4, cepa TVP360, em uma cinética de 30 minutos; 2, 8, 24 e 48 horas.
- II. Avaliar a cinética de expressão dos genes das citocinas IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e da enzima NOS2 por PCR em tempo real.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Cultivo celular**

As células RAW 264.7, linhagem celular de macrófagos leucêmicos murinos (ou em inglês, *Mouse leukaemic monocyte macrophage cell line*), foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm<sup>2</sup> (BD Biosciences, Bedford, MA, US) com 5 ml de meio DMEM *Dulbecco's Modified Eagle Medium* Gibco® (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US) contendo 10% de soro fetal bovino e *Pen Strep* Gibco® (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US) 1%, que contém os antibióticos Penicilina (10000 U/ml) e Estreptomicina (10000 µg/ml), HEPES 2,5% (CellPro, Inc., Bothell, WA, US), Piruvato de Sódio 1% (Sigma-Aldrich®, Saint Louis, MO, US) e L-glutamina 1% Gibco® (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US). A garrafa de cultura foi mantida em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> do modelo *Innova® CO<sub>2</sub> Incubators CO-170* (New Brunswick Scientific, Enfield, CT, US) a 37°C. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias. As células foram repicadas sempre que atingiram 80-90% de confluência.

O repique foi feito removendo-se o meio de cultura e lavando-se a garrafa com 1 ml de PBS 1X Gibco® (NaCl 137 mM; 2,7 mM KCl 2,7 mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,3 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM) (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US). Esse PBS foi ressuspendido várias vezes para soltar o excesso de células aderidas ao fundo da garrafa. Em seguida, o PBS foi totalmente aspirado e descartado. Logo após, foram adicionados 5 ml de meio de cultura DMEM completo com 10% de SFB.

#### **3.2. Infecção de macrófagos murinos RAW 264.7 com DENV-1 e DENV-4**

Os vírus da dengue, sorotipo DENV-1, cepa BR/90 e DENV-4, cepa TVP360, foram cedidos pela Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos do Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ-PR) de Curitiba, Paraná.

Antes da infecção de células RAW 264.7 com DENV-1-BR/90 e da estimulação com toxina bacteriana LPS (1 µg/ml) (lipopolissacarídeo de parede celular de bactérias Gram-negativas) foram feitas 2 soluções. A solução de vírus foi feita com 3 ml de DENV-1 cepa BR/90 com titulação de  $7,5 \times 10^5$  UFF/ml mais 5 ml de meio DMEM com SFB 1%, totalizando 8 ml de solução, suficiente para distribuir 500 µl/poço em 15

poços. Devido à pouca quantidade de alíquotas de DENV-1 disponíveis, a máxima Multiplicidade de Infecção (MOI, do inglês *Multiplicity of Infection*) que pôde ser utilizada, com 3 ml de vírus de titulação  $7,5 \times 10^5$  UFF/ml, para a infecção com DENV-1 foi de 0,1. A solução de LPS foi feita com 800 µl de LPS (1 µg/ml) mais 15,2 ml de meio DMEM completo com SFB 10%, em tubo do tipo Falcon<sup>TM</sup> de 50 ml (BD Biosciences, Bedford, MA, US), totalizando 16 ml de solução suficiente para distribuir 1 ml/poço em 15 poços.

As células RAW 264.7 foram removidas da garrafa de cultura com 1 ml de PBS 1X após a aspiração do meio de cultura. Em seguida foram colocadas em um tubo Falcon<sup>TM</sup> de 15 ml (BD Biosciences, Bedford, MA, US), submetidas a uma centrifugação a 4°C por 8 minutos a 1.400 rpm sem intervalo em centrífuga refrigerada modelo *Centrifuge 5804R* (Eppendorf, Hamburg, HH, DE) e ressuspensas em 3 ml de meio DMEM completo 10%. Em seguida, foi realizada a contagem de células por exclusão de viabilidade celular com o corante azul de Trypan Gibco<sup>®</sup> (Life Technologies<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA, US) (20 µl da amostra e 180 µl de azul de Trypan, numa diluição de 1:10) em câmara de Neubauer (Marienfeld, Lauda-Königshofen, BW, DE). A concentração de células foi ajustada para  $4 \times 10^6$  células totais em uma solução com 2,45 ml de células mais 32,5 ml de meio DMEM completo 10%, totalizando 35 ml suficientes para distribuir 1 ml/poço desta solução em 33 poços, de modo que em cada poço fossem adicionadas  $2,8 \times 10^5$  células. Desta forma, em cada poço foram distribuídas  $2,8 \times 10^5$  células e 1 ml/poço de solução de células com meio.

As placas de cultura foram mantidas por 24 h em estufa a 5% de CO<sub>2</sub> do modelo *Innova<sup>®</sup> CO<sub>2</sub> Incubators CO-170* (New Brunswick Scientific, Enfield, CT, US) a 37°C. Após 24 h de aderência das células RAW 264.7 aos poços das placas, todos os poços foram lavados 1 vez com PBS 1X Gibco<sup>®</sup> (Life Technologies<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA, US) para remover as células em suspensão. Em seguida, os macrófagos foram infectados com DENV-1 cepa BR/90 de MOI igual a 0,1 ou estimulados com LPS (1 µg/ml). A distribuição das placas foi feita do modo como está apresentado na Figura 10.

Em 5 placas de 6-poços (TPP, Trasadingen, SH, CH), as células de 3 poços foram infectadas por DENV-1 cepa BR/90, portanto, em triplicata, e receberam 500 µl/poço da solução de vírus. Nas mesmas 5 placas, as células dos outros 3 poços foram estimuladas com LPS (1 µg/ml) (Figura 9). Portanto, foi adicionado 1 ml/poço da solução de LPS



e essas células foram o controle positivo também em triplicata. Os controles positivos foram estimulados com LPS (1 µg/ml), pois, sabe-se que ele induz a ativação dos macrófagos peritoneais estimulados em relação aos que não receberam estímulo (SASADA *et al.*, 1983). Uma sexta placa teve 3 poços reservados para o controle negativo em triplicata, cujas células não receberam nenhum estímulo ou infecção (Figura 10).

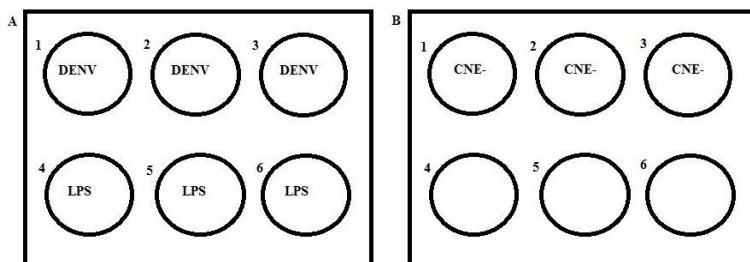
Para a extração de RNA dos macrófagos infectados com DENV-1 e dos macrófagos estimulados com LPS (1 µg/ml) foram escolhidos 5 pontos de tempo, horas pós-infecção (h.p.i.): 0,5 h.p.i.; 2 h.p.i.; 8 h.p.i.; 24 h.p.i. e 48 h.p.i., que representam as cinco placas de tempos pós-infecção diferentes. A extração de RNA de cada placa foi realizada após o tempo pós-infecção determinado para cada placa. Duas horas após a infecção, os macrófagos presentes na placa do controle negativo foram submetidos à extração de RNA.

Duas horas após a infecção, foi acrescentado mais 1 ml de meio DMEM completo, contendo 10% de SFB, por poço em todos os poços das placas de 8, 24, 48 h.p.i e dos controles negativos, para garantir mais nutrientes aos macrófagos durante os tempos de espera após a infecção e estímulo até as extrações de RNA. Esse volume de meio DMEM completo 10% não pôde ser adicionado previamente à infecção pelo vírus, nos poços com infecção por DENV-1 cepa BR/90, para que não interferisse na adsorção dos vírus à membrana celular dos macrófagos.

A infecção dos macrófagos RAW 264.7 com o DENV-4 foi realizada da mesma forma que foi feita com o DENV-1. A única diferença ocorreu na solução de vírus e na solução de células. O DENV-4 foi expandido em células Huh-7 (linhagem celular de hepatoma humano, do inglês, *human hepatoma cell line*) e na 8ª passagem, 4 dias após a infecção destas células, os vírus foram coletados. O DENV-4 cepa TVP360 é um vírus adaptado a linhagens de células humanas.

Entretanto, a titulação do DENV-4 e sua MOI não puderam ser calculados. A solução de vírus foi feita com 1 ml de DENV-4 mais 7 ml de meio DMEM com SFB 1%, totalizando 8 ml de solução, suficiente para distribuir 500 µl/poço em 15 poços. A concentração de células foi ajustada para  $2,8 \times 10^6$  células totais em uma solução com 4 ml de células mais 30 ml de meio DMEM completo 10%, totalizando 34 ml suficientes para distribuir 1 ml/poço desta solução em 33 poços, de modo que em cada poço fossem adicionadas  $3,3 \times 10^5$  células. Desta

forma, em cada poço foram distribuídas  $3,3 \times 10^5$  células e 1 ml/poço de solução de células com meio.



**Figura 10.** Esquematização das placas 6-poços de cultura de macrófagos. **A)** Esquema feito para as 5 placas que representam 5 pontos de tempo (0,5 h.p.i.; 2 h.p.i.; 8 h.p.i.; 24 h.p.i. e 48 h.p.i.), observe que foi feita uma triplicata dos macrófagos infectados com o DENV-1 ou DENV-4 (poços 1 a 3) e uma triplicata do controle positivo com LPS (poços 4 a 6). **B)** Esquema da placa com a triplicata do controle negativo (CNE-), ou seja, sem infecção e/ou estímulo.

### 3.3. Extração de RNA total dos macrófagos murinos RAW 264.7

A extração de RNA total foi realizada com o kit *RNeasy® Mini Kit* (QIAGEN®, Hilden, NW, DE) após o tempo de infecção ou estímulo com LPS determinado para cada amostra de acordo com as instruções do fabricante. Primeiramente, foi aspirado o meio dos poços das placas de cultura contendo os macrófagos aderidos. Em seguida, cada poço foi lavado uma vez com 1 ml de solução salina tamponada com fosfato PBS 1X Gibco® (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US). O PBS foi então removido e a cada poço foram adicionados 350 µl de tampão RLT Buffer, tampão de lise do kit com o qual as células foram lisadas. O tampão RLT contém guanidina tiocianato e está relacionado com a ativação de Rnases e o isolamento do RNA.

As células foram dissociadas com PBS 1X Gibco® (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US) gelado. Os lisados foram homogeneizados com ponteiras P-1000 nos próprios poços das placas. Em seguida, foram adicionados mais 350 µl de etanol 70% aos lisados nos poços e novamente homogeneizados. Os 700 µl totais de amostra de cada poço foram transferidos cada um para uma coluna de *spin* do kit acoplada em cima de um tubo coletor. O tampão RLT e o etanol, juntos,

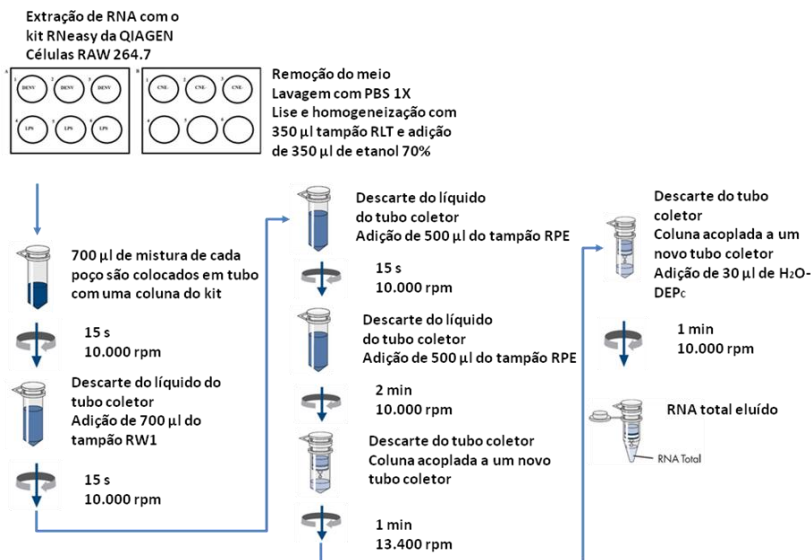
facilitam a ligação do RNA à membrana de sílica-gel presente dentro da coluna do kit.

Em seguida, as colunas foram submetidas à centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm numa microcentrífuga *MiniSpin plus*<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, HH, DE). O volume de líquido que passou para o tubo coletor foi descartado. Em seguida foram adicionados 700 µl do tampão RW1 Buffer à coluna de *spin*. O tampão RW1 contém uma pequena quantidade de guanidina tiocianato e etanol, e está relacionado com a lavagem do RNA ligado à membrana de sílica-gel.

A seguir, as colunas foram novamente submetidas à centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm. O volume que passou para o tubo coletor foi mais uma vez descartado. Após a centrifugação, foram adicionados 500 µl de tampão RPE Buffer (já contendo 4 volumes de etanol (96–100%), como determina o manual de instruções) à coluna do kit. O tampão RPE está relacionado com a lavagem para remoção de contaminantes.

Logo em seguida, a coluna foi submetida à centrifugação por 15 segundos a 10.000 rpm. Sendo o volume de líquido que passou para o tubo coletor descartado mais uma vez.

Foram então adicionados 500 µl de tampão RPE Buffer à coluna de *spin*. As colunas foram submetidas à centrifugação por 2 minutos a 10.000 rpm. O tubo coletor foi descartado. Um novo tubo coletor de 2 ml (Eppendorf, Hamburg, HH, DE) foi então acoplado embaixo da coluna de *spin*. As colunas foram novamente submetidas à centrifugação, desta vez por 1 minuto a 13.400 rpm. O tubo coletor foi novamente descartado para evitar qualquer resíduo de etanol que tenha sobrado. A coluna de *spin* foi acoplada a um novo tubo coletor de 1,5 ml (Eppendorf, Hamburg, HH, DE). Em seguida, foram adicionados 30 µl de água ultrapura livre de RNase H<sub>2</sub>O-DEPc (com dietilpolicarbonato) diretamente na membrana da coluna de *spin*. Finalmente, a coluna foi submetida à centrifugação por 1 minuto a 10.000 rpm para eluir o RNA (Figura 11).



**Figura 11.** Esquematização da extração de RNA.

As concentrações dos RNAs extraídos dos macrófagos murinos foram obtidas no espectrofotômetro *NanoVue<sup>TM</sup> Plus* (GE Healthcare, Amersham, BK, GB) e em seguida armazenadas em freezer a -80°C. Esses dados foram utilizados na construção dos gráficos de concentrações de RNA com desvio padrão entre as triplicatas utilizando-se o software *GraphPad Prism 5<sup>®</sup>* (GraphPad Prism 5<sup>®</sup> software, San Diego, CA, US).

Como os iniciadores oligonucleotídeos específicos para os genes das citocinas e da enzima NOS2 utilizados nas próximas reações apresentavam éxons diferentes, foi descartada a possibilidade de contaminação com DNA, sendo, portanto, desnecessário o tratamento com DNase.

### 3.4. Síntese de cDNA por RT-PCR

Os RNAs totais das células RAW 264.7 infectadas com o DENV-1 cepa BR/90, estimuladas com LPS e dos controles sem infecção nem estímulo foram convertidos a cópias complementares de DNA (cDNA), através de amplificação enzimática utilizando-se o kit *GoScript<sup>TM</sup> Reverse Transcription System* (Promega, Madison, WI, US) e

oligonucleotídeos randômicos. O procedimento foi feito seguindo-se as instruções do manual do fabricante do kit. O passo inicial da reação consistiu na incubação de um volume equivalente a 2 µg de RNA misturado a 1 µl do oligonucleotídeo iniciador randômico (0,5 µg) e a uma quantidade suficiente de água ultrapura DEPC (livre de RNases) para completar um volume final de 15 µl de reação em um termociclador *Mastercycler*<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, HH, DE) a 70 °C durante 5 minutos. Em seguida, os tubos foram imediatamente colocados no gelo por 10 minutos e as amostras foram submetidas à centrifugação por 10 segundos a 10.000 rpm numa microcentrífuga *MiniSpin plus*<sup>®</sup> (Eppendorf, Hamburg, HH, DE), sendo mantidas no gelo até que fosse adicionada a mistura de reação da transcriptase reversa.

Em seguida, foi feita uma mistura contendo: 5 µl do tampão comercial de reação (5x) (*GoScript*<sup>™</sup> *5X Reaction Buffer*) (Promega, Madison, WI, US), 1,2 µl de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 1 µl de uma solução de 0,5 mM dNTPs (*PCR Nucleotide Mix*), 0,5 µl de *Recombinant RNasin*<sup>®</sup> *Ribonuclease Inhibitor* (20 U/µl) (Promega, Madison, WI, US), 1 µl da enzima transcriptase reversa (*GoScript*<sup>™</sup> *Reverse Transcriptase*) (5 U/µl) (Promega, Madison, WI, US) e uma quantidade suficiente de água ultrapura DEPC (livre de RNases) para completar um volume final de 10 µl de reação. A cada amostra contendo RNA e iniciadores randômicos (15 µl), foram adicionados 10 µl da mistura de reação da transcriptase reversa, totalizando 25 µl de mistura total por amostra. A reação foi incubada a 25 °C por 5 minutos no termociclador, para que ocorresse o anelamento. Em seguida, a 42 °C por 1 hora no termociclador, para que ocorresse a extensão da fita. Finalmente para a inativação da enzima transcriptase reversa, as amostras foram incubadas a 70 °C por 15 minutos no termociclador.

Os RNAs totais das células RAW 264.7 infectadas com o DENV-4, dos seus controles positivos estimulados com LPS e dos seus controles negativos também foram convertidos a cDNA com o mesmo kit, e do mesmo modo como foi feito para as outras amostras exceto por uma diferença nos volumes das soluções preparadas. A primeira mistura foi feita com um volume equivalente a 2 µg de RNA misturado a 1 µl do oligonucleotídeo iniciador randômico (0,5 µg) e a uma quantidade suficiente de água ultrapura DEPC (livre de RNases) para completar um volume final de 21 µl de reação. A segunda mistura foi feita com 7 µl do tampão comercial de reação (5x) (*GoScript*<sup>™</sup> *5X Reaction Buffer*)

(Promega, Madison, WI, US), 2,16 µl de MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), 1,8 µl de uma solução de 0,5 mM dNTPs (*PCR Nucleotide Mix*), 0,5 µl de *Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor* (20 U/µl) (Promega, Madison, WI, US), 1 µl da enzima transcriptase reversa (*GoScript™ Reverse Transcriptase*) (5 U/µl) (Promega, Madison, WI, US) e uma quantidade suficiente de água ultrapura DEPC (livre de RNases) para completar um volume final de 14 µl de reação. Assim, quando somadas as misturas 1 e 2 totalizaram 35 µl de mistura total por amostra. Os demais passos foram feitos da mesma forma para todas as amostras.

Como a menor concentração de RNA obtida no segundo experimento foi muito menor que a menor concentração de RNA obtida no primeiro experimento, o volume de reagentes no segundo experimento foi aumentado e adaptado para uma reação com um maior volume de RNA até chegar à concentração de 2 µg de RNA.

### **3.5. PCR em tempo real**

Para a quantificação da expressão gênica, foi feita uma mistura de reação, para cada uma das 33 amostras, com 5 µl de *QuantiFast® SYBR® Green PCR Mix 5X* (QIAGEN®, Hilden, NW, DE), 1 µg de cDNA, obtido através da reação de RT-PCR, e 0,25 µl dos oligonucleotídeos (senso e anti-senso) (10 µM) iniciadores específicos para amplificar os genes que codificam as citocinas de interesse e quantidade de H<sub>2</sub>O ultra-pura livre de RNases/DNases suficiente para completar 10 µl de reação.

Além disso, como controle, foram feitas reações separadas para cada uma das 33 amostras com o mesmo volume e concentração dos reagentes e dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para o gene normalizador dos níveis de expressão de mRNA que codifica a proteína hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HPRT). Cada mistura de 10 µl de reação, referente a cada amostra, foi distribuída em poços diferentes de uma placa de 96-poços específica para PCR em tempo real (BD Biosciences, Bedford, MA, US). As amostras referentes a cada par de oligonucleotídeos iniciadores foram distribuídas por placa e em duplicata. Por exemplo, na primeira placa foram colocadas apenas as misturas de reação contendo o par de iniciadores específicos para a amplificação do gene HPRT, na segunda placa, as misturas contendo o par de iniciadores específicos para a amplificação do gene TNF-α, e assim por diante. Dessa forma, foram utilizadas 6 placas no total, sendo

cada placa referente ao par de iniciadores específicos da amplificação do gene de cada citocina e do gene HPRT.

Cada reação de amplificação deu-se por repetição de 40 ciclos de 10 segundos a 95°C, 20 segundos a 60°C e 15 segundos a 95°C no equipamento de PCR em tempo real *Applied Biosystems® 7900HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US), com laser de argônio (488 nm) e alta sensibilidade. A curva de dissociação foi utilizada para verificar a especificidade do produto e consistiu de uma incubação em que a temperatura foi aumentada de 60 °C a 95 °C numa taxa de aproximadamente 1 °C/40 seg., com leitura contínua da fluorescência. Os resultados foram avaliados pelo método de quantificação relativa proposto por Livak e Schmittgen (2001) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores murinos utilizados neste trabalho para avaliar a expressão de mRNA de IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p40, NOS2 e HPRT por PCR em tempo real estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores murinos utilizados na reação de PCR em tempo real.

<b>Iniciadores</b>	<b>Senso</b>	<b>Anti-senso</b>
IFN- $\beta$	5'-AGC-TCC-AAG-AAA-GGA-CGA-ACA-T-3'	5'-GCC-CTG-TAG-GTG-AGG-TTG-ATC-T-3'
IL-10	5'-GGT-TGC-CAA-GCC-TTA-TCG-GA-3'	5'-ACC-TGC-TCC-ACT-GCC-TTG-CT-3'
IL-6	5'-GGC-CTT-CCC-TAC-TTC-ACA-AG-3'	5'-ATT-TCC-ACG-ATT-TCC-CAG-AG-3'
TNF- $\alpha$	5'-AAA-ATT-CGA-GTG-ACA-AGC-CTG-TAG-3'	5'-CCC-TTG-AAG-AGA-ACC-TGG-GAG-TAG-3'
IL-12p40	5'-CTC-ACA-TCT-GCT-GCT-CCA-CAA-G-3'	5'-AAT-TTG-GTG-CTT-CAC-ACT-TCA-GG-3'
NOS2	5'-TGC-CCC-TTC-AAT-GGT-TGG-TA-3'	5'-ACT-GGA-GGG-ACC-AGC-CAA-AT-3'
HPRT	5'-CAT-TGT-AGC-CCT-CTG-TGT-GC-3'	5'-CTG-CAT-TGT-TTT-GCC-AGT-GT-3'

O software de detecção de sequência, *Sequence Detection System* (SDS), versão 2.4 (Life Technologies<sup>TM</sup>, Carlsbad, CA, US), foi utilizado para analisar os dados após a amplificação. Os resultados foram obtidos como valores de ciclo limite, *threshold cycle* (Ct), que representam o número do ciclo no qual os níveis de fluorescência passaram como limite fixo. Os níveis de expressão foram calculados com o método  $\Delta\Delta Ct$ . Os valores Cts das amostras obtidos com a reação de PCR em tempo real foram utilizados para calcular os  $\Delta Cts$ , os  $\Delta\Delta Cts$ , os valores RQ e a média dos valores RQ para as duplicatas de cada amostra. Os valores de  $\Delta\Delta Ct$  foram calculados em relação à média dos  $\Delta Cts$  dos controles negativos sem infecção ou estímulo. Os valores Ct são expressos como meio de duas medidas independentes, e os níveis de expressão de mRNA ( $\Delta Ct$ ) para todas as amostras são expressos como sendo iguais à diferença entre a expressão do gene de interesse (Ct do gene de interesse) e a expressão do gene HPRT (Ct do gene HPRT).

Portanto, esses valores foram todos calculados em relação ao gene normalizador controle HPRT. Os valores RQ são iguais a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . A partir das médias dos valores RQ foram montados os gráficos com desvio padrão das duplicatas de cada amostra. Esses gráficos foram



feitos para indicar a expressão de cada citocina em cada grupo (infectados com DENV e estimulados com LPS). Para isso foi utilizado o software *GraphPad Prism 5*<sup>®</sup> (GraphPad Prism 5<sup>®</sup> software, San Diego, CA, US).



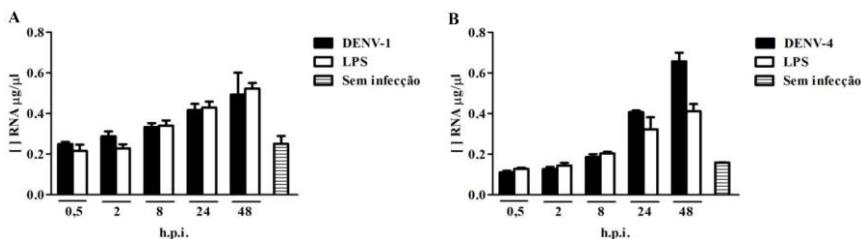
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Concentração dos RNAs

Após a extração, as concentrações de RNA foram obtidas no espectrofotômetro *NanoVue™ Plus* (GE Healthcare, Amersham, BK, GB). Os resultados obtidos foram colocados em um gráfico através do software *GraphPad Prism 5®* (GraphPad Prism 5®, San Diego, CA, US) (Figura 12). Com isso, observou-se que as concentrações de RNA foram aumentando conforme o tempo pós-infecção com DENV-1 e ou pós-estímulo com LPS (controle positivo) (1 µg/ml) (Figura 12A). Isso pode ser explicado pela proliferação celular durante esses intervalos de tempo. As concentrações de RNA obtidas no caso da infecção pelo DENV-1 foram semelhantes às concentrações obtidas no caso do estímulo com LPS (1 µg/ml).

As concentrações de RNA obtidas no caso da infecção por DENV-4 foram semelhantes às obtidas no caso do estímulo com LPS (1 µg/ml), exceto nos últimos intervalos de tempo após a infecção ou estímulo (Figura 12B). Neste caso, apesar da proliferação celular, o DENV-4 parece ter induzido uma maior produção de RNA em relação ao estímulo com LPS (1 µg/ml).

O controle negativo sem infecção ou estímulo apresentou uma menor concentração de RNA em relação aos outros dois grupos porque a extração de RNA deste controle foi realizada duas horas após o início da infecção das outras amostras. Por isso, não é possível afirmar se em outros intervalos de tempo esse controle negativo apresentaria uma maior concentração de RNA decorrente da proliferação celular.



**Figura 12.** Concentrações de RNAs extraídos das células RAW 264.7. **A)** Grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 (MOI de 0,1). **B)** Grupos relacionados à infecção pelo DENV-4. Em preto, a média das triplicatas das concentrações de RNAs purificados de células RAW 264.7 infectadas com

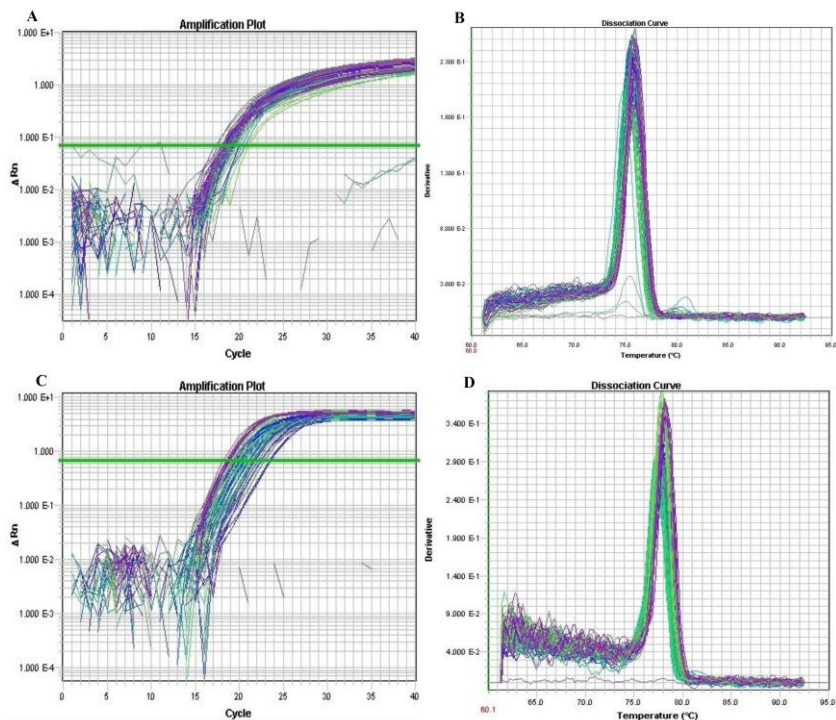
DENV em diferentes horas pós-infecção (h.p.i.). Em branco, a média das triplicatas das concentrações de RNAs purificados de células RAW 264.7 estimuladas com LPS (1 µg/ml). Em listrado, a média das triplicatas das concentrações de RNAs purificados de células RAW 264.7 sem infecção ou estímulo.

#### **4.2. Cinéticas de expressão dos genes das citocinas e da enzima NOS2 em macrófagos infectados com os vírus da Dengue sorotipos 1 e 4.**

Para a quantificação da expressão gênica, foi realizada a técnica de PCR em tempo real com iniciadores específicos para amplificar os genes que codificam as citocinas de interesse (TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6 e IL-12p40) e a enzima NOS2. Foi utilizado como controle o gene normalizador dos níveis de expressão de mRNA, o gene HPRT. As reações foram feitas no equipamento de PCR em tempo real Applied Biosystems® 7900HT Fast *Real-Time PCR System* (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US). A curva de dissociação foi utilizada para verificar a especificidade do produto.

A análise dos dados após a amplificação foi feita com o software de detecção de sequência, *Sequence Detection System* (SDS), versão 2.4 (Life Technologies™, Carlsbad, CA, US). Os resultados foram obtidos como valores de ciclo limite, *threshold cycle* (Ct), que representam o número do ciclo no qual os níveis de fluorescência passaram como limite fixo. Os níveis de expressão foram calculados com o método  $\Delta\Delta Ct$ . Os valores Ct são expressos como meio de duas medidas independentes, e os níveis de expressão de mRNA ( $\Delta Ct$ ) para todas as amostras são expressos como sendo iguais à diferença entre a expressão do gene de interesse (Ct do gene de interesse) e a expressão do gene HPRT (Ct do gene HPRT).

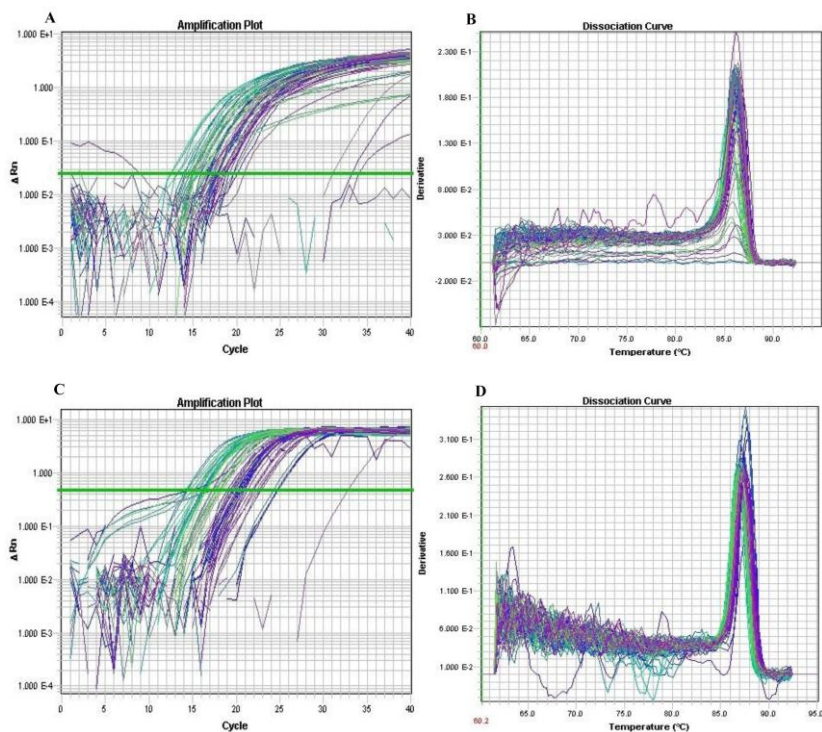
O primeiro gene a ter a sua transcrição analisada por PCR real time foi o gene normalizador, controle positivo, HPRT, tanto para o grupo infectado com DENV-1 e os seus controles como para o grupo infectado com o DENV-4 e os seus controles (Figura 13). Em ambos os casos, todas as 33 amostras, em duplicata, apresentaram amplificação para este gene, quando foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o mesmo.



**Figura 13.** Curvas de amplificação e dissociação do gene HPRT. **A)** Curva de amplificação por qPCR do cDNA do gene normalizador controle HPRT dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 (MOI de 0,1). O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de cada uma das 33 amostras infectadas com DENV-1 ou estimuladas com LPS (1 µg/ml) e dos controles negativos sem infecção ou estímulo. **B)** Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene HPRT dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1. **C)** Curva de amplificação do cDNA do gene HPRT dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4. **D)** Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene HPRT dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4.

O segundo gene a ter a sua transcrição analisada, foi o TNF- $\alpha$  tanto para as amostras infectadas com o DENV-1 e os seus controles positivos e negativos como para as amostras infectadas com o DENV-4 e os seus controles (Figura 14). Em ambos os casos, todas as 33

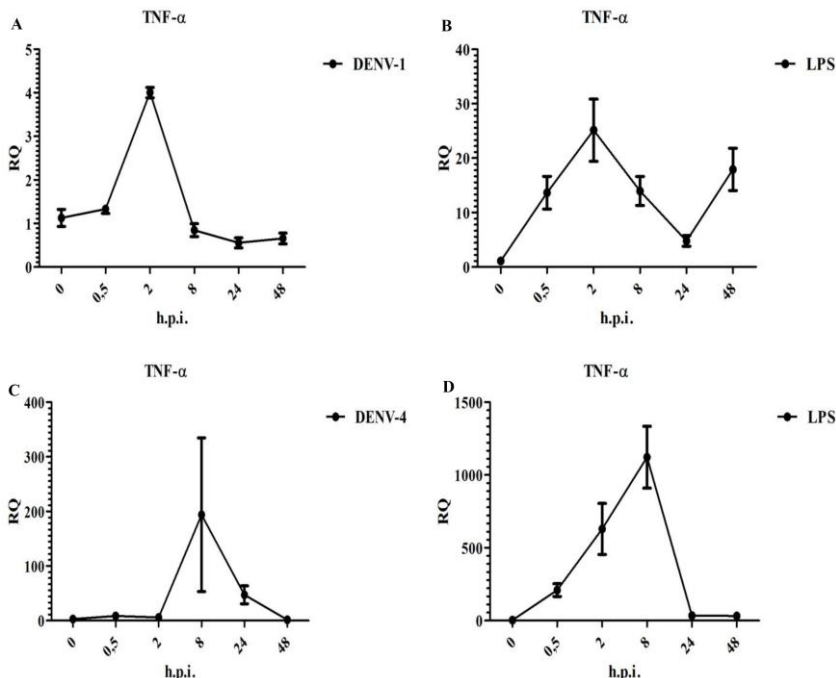
amostras, em duplicata, apresentaram amplificação para este gene, quando foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o mesmo.



**Figura 14.** Curvas de amplificação e dissociação do gene do TNF- $\alpha$ . A) Curva de amplificação por qPCR do cDNA do gene do TNF- $\alpha$  dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 (MOI de 0,1). O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de cada uma das 33 amostras infectadas com DENV-1 ou estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml) e dos controles negativos sem infecção ou estímulo. B) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene do TNF- $\alpha$  dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1. C) Curva de amplificação do cDNA do gene do TNF- $\alpha$  dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4. D) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene do TNF- $\alpha$  dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4.

Após a confirmação da amplificação do gene do TNF- $\alpha$ , foram construídos os gráficos com a média dos valores RQ das duplicatas (do PCR em tempo real) de cada amostra do grupo de células infectadas com DENV-1 e do grupo de células submetidas ao estímulo com LPS (1  $\mu$ g/ml) para os períodos de tempo descritos anteriormente. Nos gráficos, foram colocados os controles sem infecção ou estímulo na hora inicial zero. Com isso, para ambos os grupos, observou-se um pico de expressão desse gene em 2 horas pós-infecção, tendo em seguida ocorrido uma queda dessa expressão a partir de 8 horas pós-infecção (Figuras 15A e 15B). Portanto, ambos os grupos apresentaram cinéticas de resposta de expressão deste gene semelhantes, indicando a expressão intermediária deste gene. Entretanto, os níveis de expressão do gene do TNF- $\alpha$  dos dois grupos não podem ser comparados entre si, uma vez que, a infecção por DENV-1 induziu uma expressão do gene do TNF- $\alpha$  muito menor do que o estímulo por LPS (1  $\mu$ g/ml).

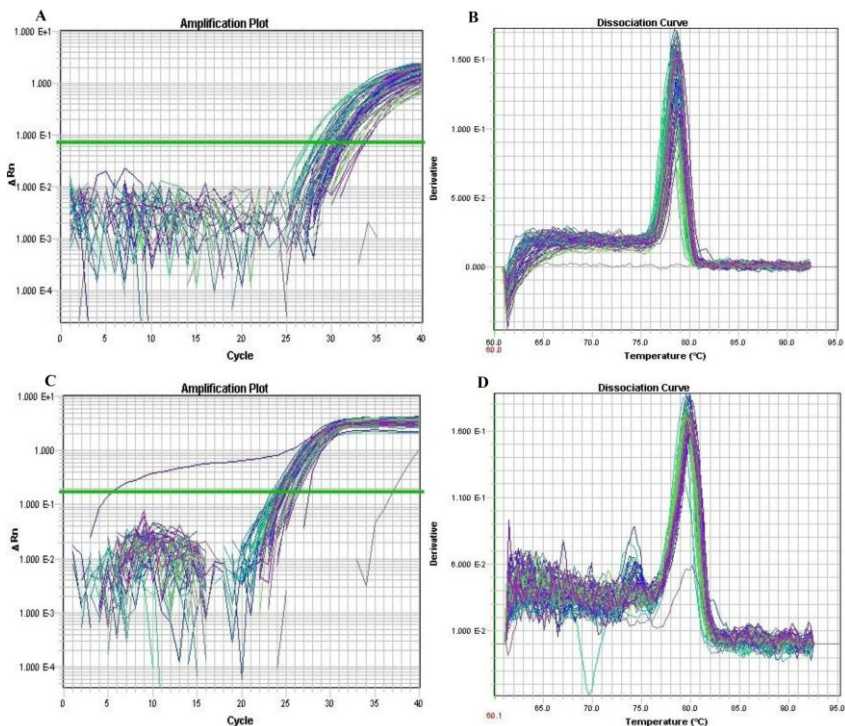
No caso dos grupos infectados pelo DENV-4 e controle positivo estimulado com LPS (1  $\mu$ g/ml), observou-se um pico de expressão do gene do TNF- $\alpha$  em 8 horas pós-infecção, tendo em seguida ocorrido uma queda dessa expressão em 24 horas pós-infecção. Portanto, ambos os grupos apresentaram cinéticas de resposta de expressão semelhantes (Figuras 15C e 15D). Esse resultado indica que numa infecção por DENV-4, este gene pode apresentar expressão intermediária-tardia em relação à infecção pelo DENV-1. No caso da infecção pelo DENV-4 houve uma maior expressão do gene do TNF- $\alpha$  se comparada à da infecção pelo DENV-1. Isto indicaria que a MOI do DENV-4 pode ter sido maior do que a do DENV-1, induzindo uma maior expressão do gene desta citocina.



**Figura 15.** Níveis de expressão do gene do TNF- $\alpha$  em células RAW 264.7. **A)** Grupo infectado com DENV-1 (MOI de 0,1). **B)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1  $\mu$ g/ml) relacionado à infecção pelo DENV-1. Em ambos os grupos o pico se deu em 2 h.p.i. **C)** Grupo infectado com DENV-4. **D)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1  $\mu$ g/ml) relacionado à infecção pelo DENV-4. Em ambos os grupos ocorreu um pico de expressão em 8 h.p.i.

O terceiro gene a ter a sua taxa de transcrição analisada, foi o IFN- $\beta$  tanto para os grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 como para os grupos relacionados à infecção pelo DENV-4 (Figura 16). Em cada caso, todas as 33 amostras, em duplicata, apresentaram amplificação para este gene, quando foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o mesmo.





**Figura 16.** Curvas de amplificação e dissociação do gene do IFN- $\beta$ . A) Curva de amplificação por qPCR do cDNA do gene do IFN- $\beta$  dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 (MOI de 0,1). O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de cada uma das 33 amostras infectadas com DENV-1 ou estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml) e dos controles negativos sem infecção ou estímulo. B) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene do IFN- $\beta$  dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1. C) Curva de amplificação do cDNA do gene do IFN- $\beta$  dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4. D) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene do IFN- $\beta$  dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4.

No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-1 observou-se um pequeno pico de expressão do gene do IFN- $\beta$ , em meia hora após a infecção, sendo que quase não ocorreu expressão deste gene

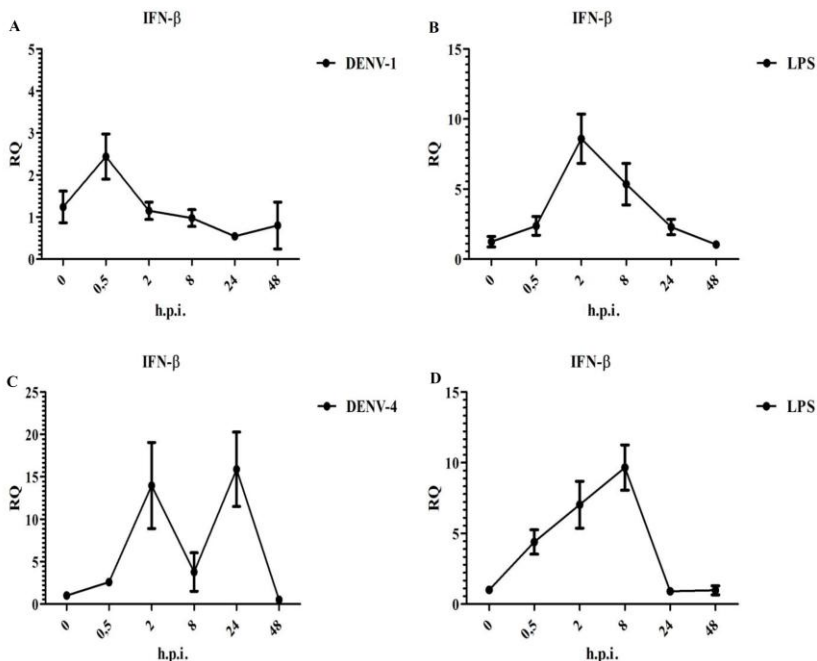
(Figura 17A). Ainda assim, isto poderia indicar que este gene, neste caso, apresentaria expressão precoce.

No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), o pico de expressão do gene do IFN-β se deu em 2 horas após o estímulo e a queda dos níveis de expressão se deu a partir de 8 horas após o estímulo (Figura 17B). Uma explicação para esta diferença é que um mesmo gene pode se comportar diferentemente em relação a diferentes indutores e a diferentes concentrações de um mesmo indutor. Portanto, este gene poderia ter uma ativação intermediária no grupo estimulado com LPS (1 µg/ml), cujo pico se dá em 2 horas após o estímulo.

Dessa forma, os níveis de expressão do gene desta citocina não podem ser comparados entre os dois grupos, principalmente porque a infecção por DENV-1 quase não induziu expressão do gene do IFN-β.

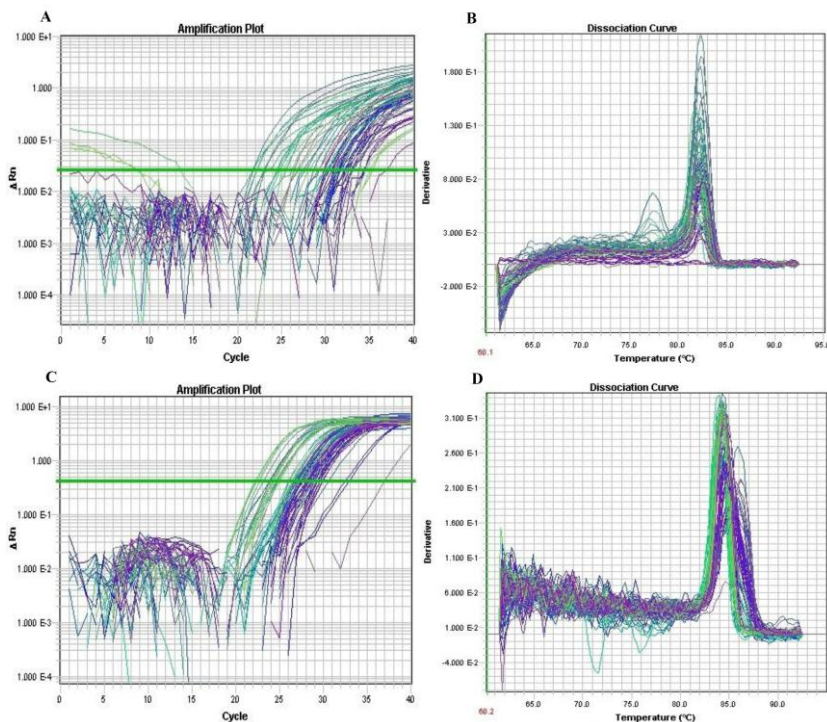
No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-4 observou-se picos de expressão do gene do IFN-β em 2 e 24 horas pós-infecção. Isto poderia indicar que, em caso de infecção por DENV-4, este gene apresenta expressão intermediária e tardia. Em relação à infecção por DENV-1, a infecção por DENV-4 induziu uma maior expressão do gene do IFN-β (Figura 17C). Isto indicaria que a MOI do DENV-4 pode ter sido maior do que a do DENV-1, induzindo uma maior expressão do gene desta citocina. Além disso, em relação ao grupo estimulado com LPS (1 µg/ml), o DENV-4 também induziu uma maior expressão deste gene.

No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), o pico de expressão do gene do IFN-β se deu em 8 horas após o estímulo (Figura 17D). Neste grupo, este gene apresentou uma ativação intermediária-tardia.



**Figura 17.** Níveis de expressão do gene do IFN- $\beta$  em células RAW 264.7. **A)** Grupo infectado com DENV-1 (MOI de 0,1). Ocorreu um pequeno pico em 0,5 h.p.i., porém num nível basal. **B)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1  $\mu$ g/ml) relacionado à infecção pelo DENV-1. Neste grupo o pico ocorreu em 2 h.p.i. **C)** Grupo infectado com DENV-4. Neste grupo, ocorreram picos em 2 e 24 h.p.i. **D)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1  $\mu$ g/ml) relacionado à infecção pelo DENV-4. Neste grupo o pico se deu em 8 h.p.i.

O quarto gene a ter a sua taxa de transcrição analisada, foi o da IL-10 tanto para os grupos relacionados à infecção por DENV-1 quanto para os grupos relacionados à infecção por DENV-4 (Figura 18). Em cada caso, todas as 33 amostras, em duplicata, apresentaram amplificação para este gene, quando foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o mesmo.

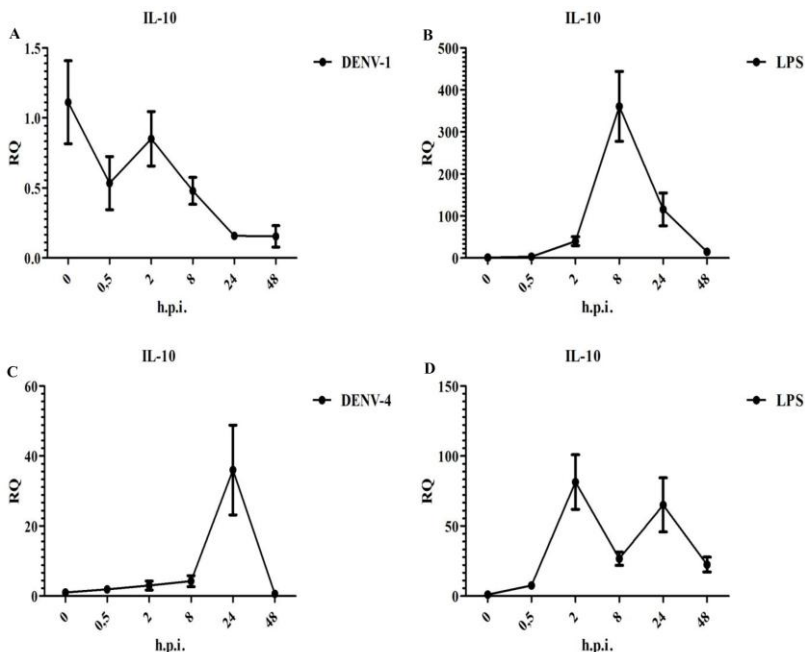


**Figura 18.** Curvas de amplificação e dissociação do gene da IL-10. A) Curva de amplificação por qPCR do cDNA do gene da IL-10 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 (MOI de 0,1). O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de cada uma das 33 amostras infectadas com DENV-1 ou estimuladas com LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) e dos controles negativos sem infecção ou estímulo. B) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da IL-10 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1. C) Curva de amplificação do cDNA do gene da IL-10 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4. D) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da IL-10 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4.

No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-1 praticamente não ocorreu um pico, pois os níveis de expressão deste gene ficaram próximos ou menores do que os níveis basais, ou seja, do que os níveis de expressão deste gene no grupo controle negativo em

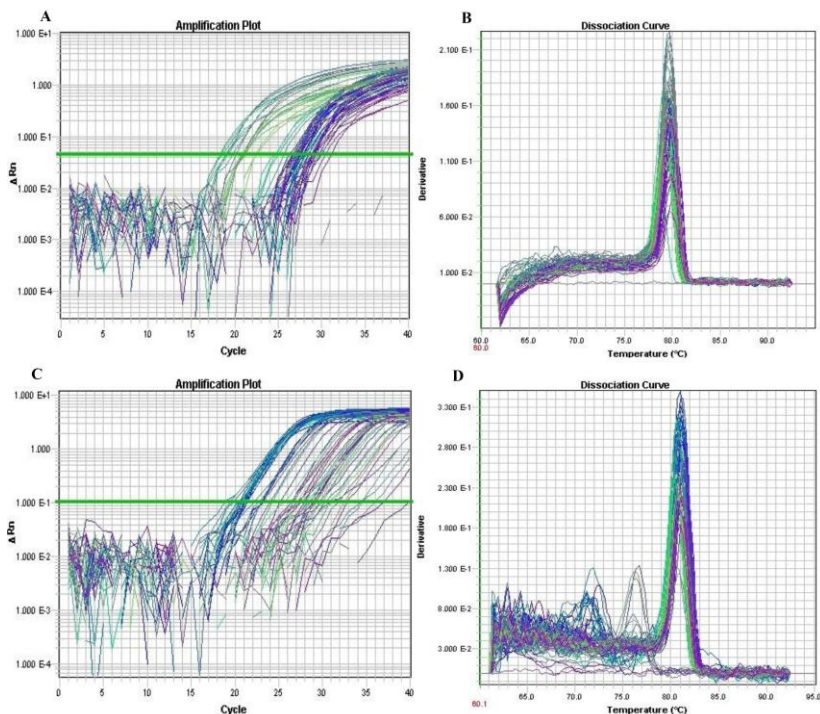
zero hora, isto é, sem infecção (Figura 19A). No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu grande expressão do gene da IL-10, com pico de expressão do gene da IL-10 em 8 horas após o estímulo (Figura 19B). A queda dos níveis de expressão se deu a partir de 24 horas após o estímulo. Uma explicação para esta diferença é que a MOI de 0,1 do DENV-1 pode ter sido muito baixa para induzir grande expressão do gene da IL-10. No caso do estímulo com LPS (1 µg/ml), ocorreu grande expressão tardia de IL-10, com pico em 8 horas após o estímulo. Dessa forma, as cinéticas de expressão deste gene em ambos os grupos são muito diferentes entre si. Os níveis de expressão do gene da IL-10 não podem ser comparados entre os dois grupos.

No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-4 ocorreu grande expressão do gene da IL-10 com pico em 24 horas após a infecção (Figura 19C). Em relação à infecção pelo DENV-1, o DENV-4 induziu uma maior expressão do gene da IL-10. Isto indicaria que a MOI do DENV-4 pode ter sido maior do que a do DENV-1, induzindo uma maior expressão do gene desta citocina. No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu uma maior expressão do gene da IL-10, em relação à infecção pelo DENV-4, ocorrendo picos em 2 e 24 horas após o estímulo (Figura 19D). A queda dos níveis de expressão se deu a partir de 48 horas após o estímulo. Uma explicação para esta diferença é que este gene poderia ter ativação tardia no grupo de células infectadas com DENV-4 e, por outro lado, ter ativação intermediária e tardia no grupo estimulado com LPS (1 µg/ml). Dessa forma, as cinéticas de expressão deste gene em ambos os grupos apresentam uma semelhança que é o pico de expressão do gene desta citocina em 24 horas após a infecção ou estímulo.



**Figura 19.** Níveis de expressão do gene da IL-10 em células RAW 264.7. **A)** Grupo infectado com DENV-1 (MOI de 0,1). Ocorreu um pequeno pico em 2 h.p.i., porém num nível basal. **B)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1 µg/ml) relacionado à infecção pelo DENV-1. Neste grupo o pico ocorreu em 8 h.p.i. **C)** Grupo infectado com DENV-4. Neste grupo ocorreu pico em 24 h.p.i. **D)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1 µg/ml) relacionado à infecção pelo DENV-4. Neste grupo, ocorreram picos em 2 e 24 h.p.i.

O quinto gene a ter a sua taxa de transcrição analisada, foi o da IL-6, tanto para os grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 como para os grupos relacionados à infecção pelo DENV-4 (Figura 20). Em ambos os casos, todas as 33 amostras, em duplicata, apresentaram amplificação para este gene, quando foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o mesmo.



**Figura 20.** Curvas de amplificação e dissociação do gene da IL-6. A) Curva de amplificação por qPCR do cDNA do gene da IL-6 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 (MOI de 0,1). O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de cada uma das 33 amostras infectadas com DENV-1 ou estimuladas com LPS (1 µg/ml) e dos controles negativos sem infecção ou estímulo. B) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da IL-6 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1. C) Curva de amplificação do cDNA do gene da IL-6 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4. D) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da IL-6 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4.

No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-1 os níveis de expressão do gene da IL-6 foram muito baixos, embora um pouco maior do que os níveis basais do controle negativo em zero hora, sem infecção (Figura 21A). Ainda assim, houve um pequeno pico de

expressão desta citocina em meia hora após a infecção, indicando que este gene pode ter uma expressão precoce.

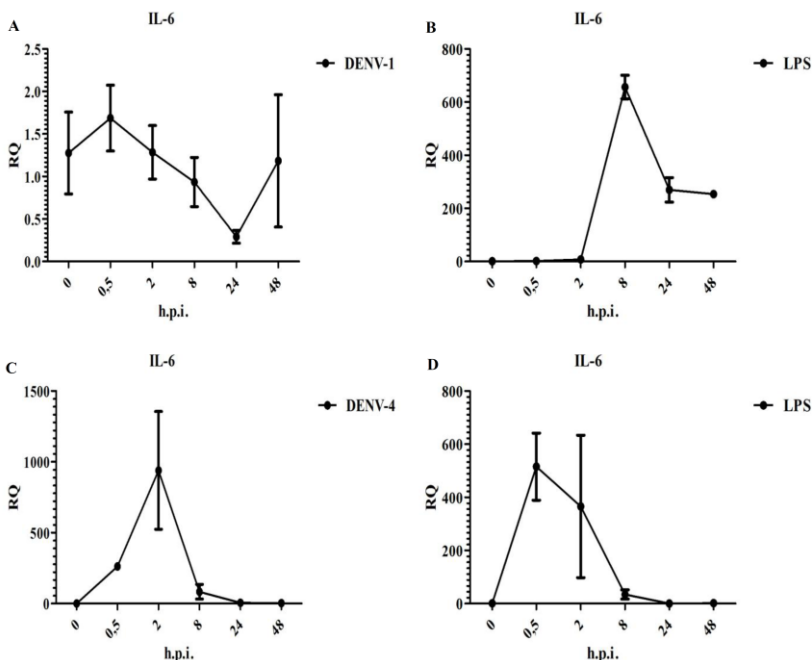
No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu grande expressão do gene da IL-6, ocorrendo um pico de expressão do gene da IL-6 em 8 horas após o estímulo (Figura 21B), indicando, neste caso, uma expressão intermediária-tardia deste gene. A queda dos níveis de expressão neste grupo se deu a partir de 24 horas após o estímulo.

Os níveis de expressão do gene da IL-6 não podem ser comparados entre os grupos infectado com DENV-1 e estimulado com LPS 1 (µg/ml), uma vez que, a infecção por DENV-1 induziu uma pequena resposta de expressão do gene da IL-6 e o estímulo por LPS (1 µg/ml) induziu altos níveis de expressão do mesmo gene.

No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-4 os níveis de expressão do gene da IL-6 foram muito altos, inclusive maiores do que os níveis de expressão do mesmo gene em células estimuladas com LPS (1 µg/ml) e em células infectadas pelo DENV-1 (Figura 21C). Isto indicaria que a MOI do DENV-4 pode ter sido maior do que a do DENV-1, induzindo uma maior expressão do gene desta citocina. O pico de expressão em células infectadas com o DENV-4 ocorreu em 2 horas após a infecção, indicando que este gene, neste caso, apresentou expressão intermediária.

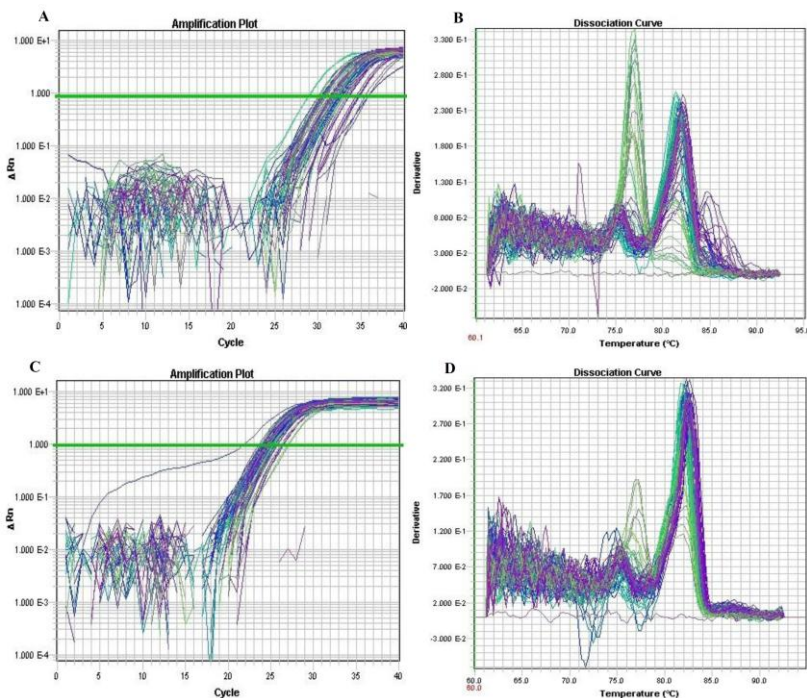
No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml) o pico de expressão do gene da IL-6 se deu em meia hora após o estímulo (Figura 21D), indicando, neste caso, uma expressão precoce deste gene.





**Figura 21.** Níveis de expressão do gene da IL-6 em células RAW 264.7. **A)** Grupo infectado com DENV-1 (MOI de 0,1). Ocorreu um pequeno pico em 0,5 h.p.i., porém num nível basal. **B)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1 µg/ml) relacionado à infecção pelo DENV-1. Neste grupo o pico ocorreu em 8 h.p.i. **C)** Grupo infectado com DENV-4. Neste grupo ocorreu pico em 2 h.p.i. **D)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1 µg/ml) relacionado à infecção pelo DENV-4. Neste grupo, ocorreu pico em 0,5 h.p.i.

O sexto gene a ter a sua taxa de transcrição analisada, foi o da IL-12p40, tanto para os grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 como para os grupos relacionados à infecção pelo DENV-4 (Figura 22). Em ambos os casos, todas as 33 amostras, em duplicata, apresentaram amplificação para este gene, quando foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o mesmo.



**Figura 22.** Curvas de amplificação e dissociação do gene da IL-12p40. A) Curva de amplificação por qPCR do cDNA do gene da IL-12p40 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 (MOI de 0,1). O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de cada uma das 33 amostras infectadas com DENV-1 ou estimuladas com LPS (1 µg/ml) e dos controles negativos sem infecção ou estímulo. B) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da IL-12p40 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1. C) Curva de amplificação do cDNA do gene da IL-12p40 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4. D) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da IL-12p40 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4.

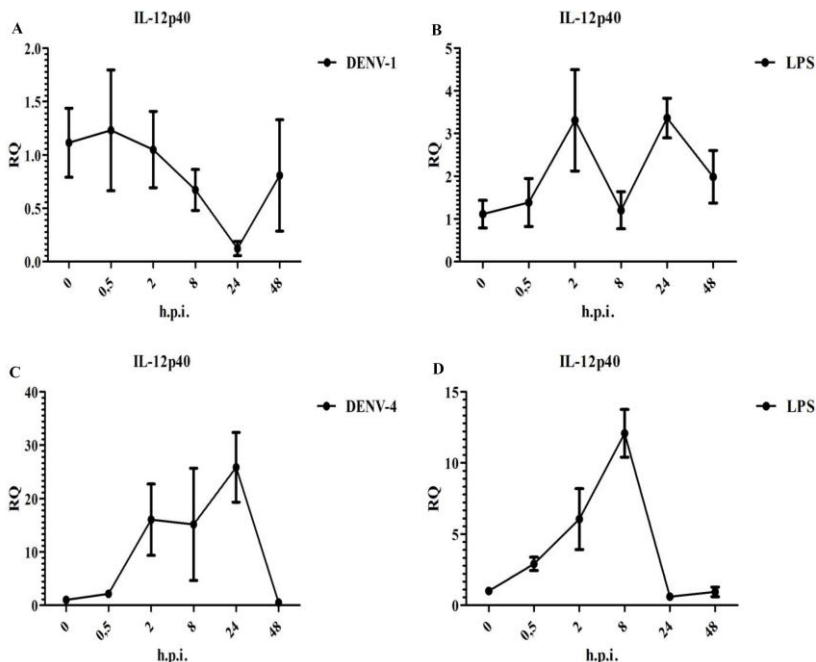
No grupo de células infectadas com DENV-1 ocorreu uma expressão reduzida do gene da IL-12p40 (Figura 23A). No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu pouca expressão do gene da IL-12p40, em relação ao grupo controle negativo em zero hora, ocorrendo pequenos picos de expressão do gene da IL-12p40 em 2 e 24

horas após o estímulo (Figura 23B), indicando uma expressão intermediária e tardia deste gene. Neste caso, as cinéticas de expressão deste gene entre os dois grupos apresentaram padrões muito diferentes.

Os níveis de expressão do gene da IL-12p40 não podem ser comparados entre os grupos de células infectadas com DENV-1 e células estimuladas com LPS (1 µg/ml), uma vez que, a infecção por DENV-1 induziu uma pequena expressão do gene da IL-12p40 e o estímulo por LPS (1 µg/ml) induziu uma expressão do gene da IL-12p40 um pouco maior.

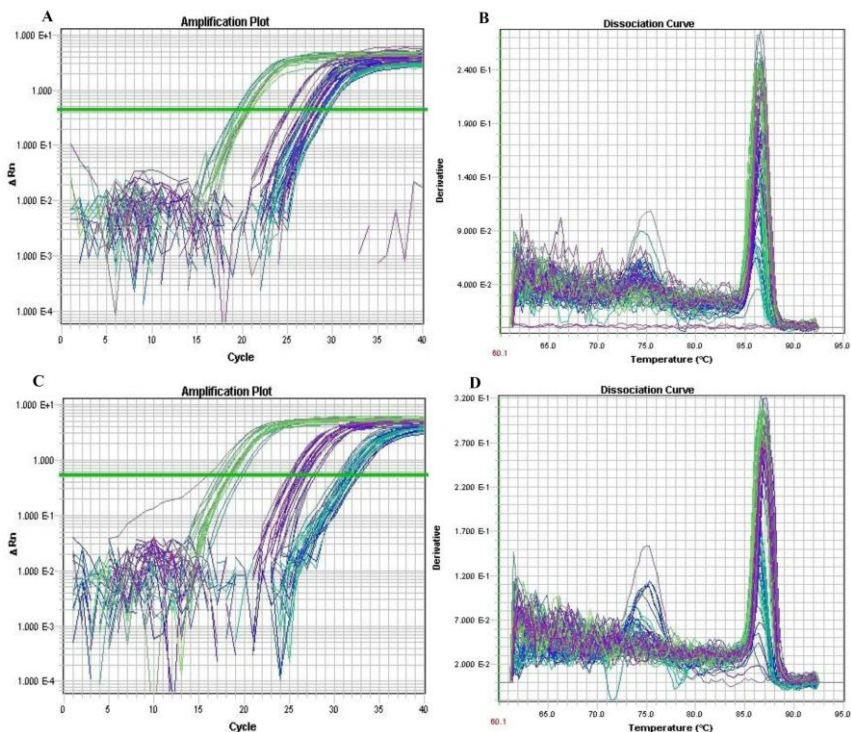
No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-4 os níveis de expressão do gene da IL-12p40 foram muito altos, inclusive maiores do que os níveis de expressão do mesmo gene em células estimuladas com LPS (1 µg/ml) e em células infectadas pelo DENV-1 (Figura 23C). Isto indicaria que a MOI do DENV-4 pode ter sido maior do que a do DENV-1, induzindo uma maior expressão do gene desta citocina. O pico de expressão em células infectadas com o DENV-4 ocorreu em 24 horas após a infecção, indicando que este gene, neste caso, apresentou expressão tardia.

No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml) o pico de expressão do gene da IL-12p40 se deu em 8 horas após o estímulo (Figura 23D), indicando, neste caso, uma expressão intermediária-tardia deste gene.



**Figura 23.** Níveis de expressão do gene da IL-12p40 em células RAW 264.7. **A)** Grupo infectado com DENV-1 (MOI de 0,1). Ocorreu um pequeno pico em 0,5 h.p.i., porém num nível basal. **B)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1 µg/ml) relacionado à infecção pelo DENV-1. Neste grupo, ocorreram picos em 2 e 24 h.p.i. **C)** Grupo infectado com DENV-4. Neste grupo ocorreu pico em 24 h.p.i. **D)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1 µg/ml) relacionado à infecção pelo DENV-4. Neste grupo, ocorreu pico em 8 h.p.i.

O sétimo gene a ter a sua taxa de transcrição analisada, foi o gene da enzima NOS2, tanto para os grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 como para os grupos relacionados à infecção pelo DENV-4 (Figura 24). Em ambos os casos, todas as 33 amostras, em duplicata, apresentaram amplificação para este gene, quando foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores específicos para o mesmo.



**Figura 24.** Curvas de amplificação e dissociação do gene da NOS2. A) Curva de amplificação por qPCR do cDNA do gene da NOS2 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1 (MOI de 0,1). O eixo x do gráfico de amplificação representa a intensidade de fluorescência relativa (delta Rn) e o eixo y o ciclo da PCR. As linhas do gráfico mostram o resultado da amplificação em duplicata de cada uma das 33 amostras infectadas com DENV-1 ou estimuladas com LPS (1 µg/ml) e dos controles negativos sem infecção ou estímulo. B) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da NOS2 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-1. C) Curva de amplificação do cDNA do gene da NOS2 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4. D) Curva de dissociação dos oligonucleotídeos iniciadores específicos do gene da NOS2 dos grupos relacionados à infecção pelo DENV-4.

No grupo de células infectadas com DENV-1 os níveis de expressão do gene da NOS2 se mantiveram próximos aos níveis basais, exceto em 8 horas após a infecção, quando o nível de NOS2 começa a subir, e em 48 horas após a infecção, quando o nível de NOS2 atinge um pico, indicando uma expressão tardia deste gene, neste caso (Figura

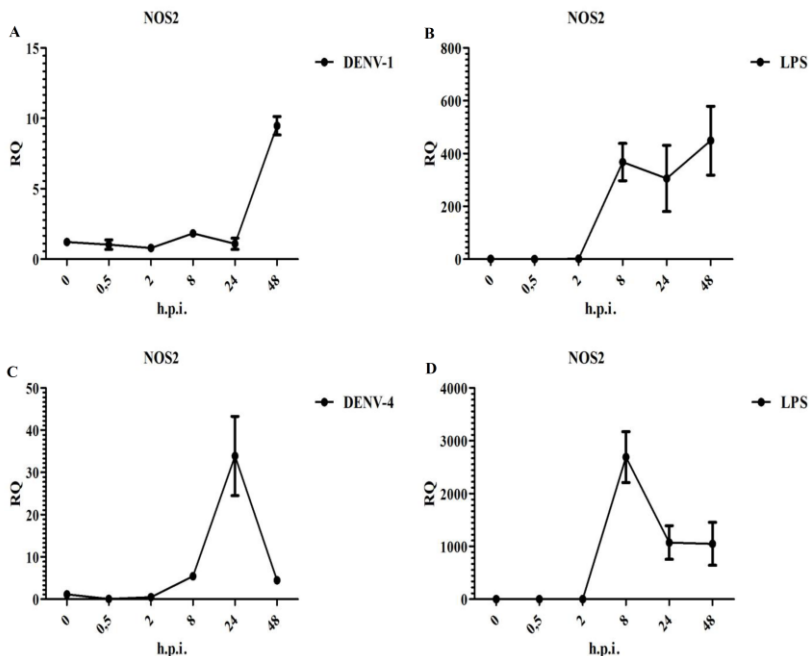
25A). Ainda assim, os níveis de expressão deste gene no grupo de células infectadas com o DENV-1 foram baixos se comparados ao grupo estimulado com LPS (1 µg/ml).

No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu grande expressão do gene da NOS2, em relação ao grupo controle negativo em zero hora, ocorrendo picos de expressão do gene da NOS2 em 8 e aumentando em 48 horas após o estímulo (Figura 25B), indicando uma expressão tardia deste gene. Portanto, em ambos os grupos, apesar das diferenças em termos de quantidade de expressão do gene da NOS2, as cinéticas de expressão foram semelhantes e indicaram que este gene é de expressão tardia em ambos os casos.

Os níveis de expressão do gene da NOS2 não podem ser comparados entre os grupos infectado com DENV-1 e estimulado com LPS 1 (µg/ml), uma vez que, em termos quantitativos, a infecção por DENV-1 induziu uma expressão do gene da enzima NOS2 muito menor do que o estímulo por LPS (1 µg/ml).

No grupo de células infectadas com DENV-4, os níveis de expressão do gene da NOS2 foram muito altos quando comparados aos da infecção com DENV-1. No caso da infecção com DENV-4, o pico de expressão do gene da NOS2 se deu em 24 horas após a infecção, indicando, neste caso, uma expressão tardia deste gene (Figura 25C). Além disso, a infecção por DENV-4 induziu maior expressão do gene da NOS2 do que a infecção por DENV-1. Isto indicaria que a MOI do DENV-4 pode ter sido maior do que a do DENV-1, induzindo uma maior expressão do gene desta citocina. O DENV-4 induziu a ativação do gene da NOS2 num tempo pós-infecção menor do que o do DENV-1.

No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu expressão exacerbada do gene da NOS2, em relação ao grupo controle negativo em zero hora, e em relação ao grupo infectado com DENV-4. No grupo estimulado com LPS (1 µg/ml), os picos de expressão do gene da NOS2 ocorreram em 8 horas após o estímulo (Figura 25D), indicando uma expressão intermediária-tardia deste gene. Portanto, as cinéticas de expressão deste gene foram diferentes entre os dois grupos.



**Figura 25.** Níveis de expressão do gene da NOS2 em células RAW 264.7. **A)** Grupo infectado com DENV-1 (MOI de 0,1). Ocorreu pico em 48 h.p.i. **B)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1 µg/ml) relacionado à infecção pelo DENV-1. Neste grupo, ocorreram picos em 8 e 48 h.p.i. **C)** Grupo infectado com DENV-4. Neste grupo ocorreu pico em 24 h.p.i. **D)** Grupo controle positivo estimulado com LPS (1 µg/ml) relacionado à infecção pelo DENV-4. Neste grupo, ocorreu pico em 8 h.p.i.





## 5. DISCUSSÃO

A ordem temporal dos eventos inflamatórios é muito semelhante em infecções por diferentes patógenos ou em danos teciduais. Os neutrófilos são as primeiras células a chegar ao sítio de inflamação, e eles permanecem por um curto período de tempo (as primeiras 24 horas). Os monócitos chegam tardiamente, mas permanecem por dias. Os processos de remodelamento de tecido ocorrem durante as últimas fases do processo inflamatório (STRAMER *et al.*, 2007).

Existem duas possibilidades de como este processo inflamatório poderia ser conduzido: cada fase poderia induzir a próxima, ou a ordem temporal dos eventos poderia ser intrinsecamente codificada nos genes envolvidos na resposta inflamatória. Através da análise de eventos em cultura de células, pesquisadores observaram que muito do curso do tempo do programa de resposta é codificado nos próprios genes (HAO & BALTIMORE, 2009). A ordem sequencial da expressão gênica e a relativa duração dos vários eventos inflamatórios parecem ser pré-estabelecidos como parte do programa de ativação dos genes. O processo parece ser o resultado da interação entre os elementos que regulam a indução da transcrição, a repressão da transcrição e a estabilidade dos mRNAs (HAO & BALTIMORE, 2009).

A indução dos genes numa resposta inflamatória depende do estímulo ou do patógeno que causou a infecção e do tipo celular. Estudos sugeriram que os grupos de genes envolvidos na resposta inflamatória podem apresentar ativação precoce, geralmente por volta de 30 minutos após a infecção ou após um estímulo; ativação intermediária, em torno de 2 horas após a infecção ou estímulo; ativação tardia, a partir de 8 horas após a infecção ou estímulo (HAO & BALTIMORE, 2009). Além disso, genes diferentes reagem de forma diferente a uma determinada concentração de um mesmo indutor, que pode ser um patógeno, estímulo ou dano tecidual. Os mesmos estudos sugeriram que uma concentração maior de indutor é capaz de levar a uma maior duração da ativação gênica, mas manter um mesmo padrão de cinética da expressão dos genes envolvidos na resposta inflamatória (HAO & BALTIMORE, 2009). Esses autores sugeriram que a estabilidade do mRNA e o controle transcricional regulam a cinética de expressão de genes ativados por citocinas. Eles observaram que a maioria dos genes ativados por TNF em macrófagos murinos e em fibroblastos murinos (3T3) apresentaram cinética de expressão semelhante. Além disso, a

cinética de expressão dos mesmos genes, quando ativados por LPS foi semelhante em macrófagos murinos.

Outros autores sugerem ainda que, é possível que os genes de resposta precoce conttenham menos agrupamentos de sítios de ligação aos fatores de transcrição próximos aos seus promotores do que os genes de resposta intermediária, ou que os sítios de ligação aos fatores de transcrição dos genes de resposta tardia são de afinidade mais baixa do que aqueles dos genes de resposta precoce, pois sítios de menor afinidade são diferentes do sítio de ligação matricial. Esses fatores poderiam reduzir a afinidade de ligação dos fatores de transcrição às regiões promotoras dos genes de resposta tardia, o que corresponderia a uma redução das suas taxas de ativação transcricional. Além disso, diferenças genômicas podem conferir a um gene uma rápida inducibilidade, tornando-o de expressão precoce (TULLAI *et al.*, 2007).

No presente trabalho, as cinéticas de expressão dos genes das citocinas TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6 e IL-12p40 e da enzima NOS2 induzidos por DENV-1 e DENV-4 foram diferentes das cinéticas de expressão dos mesmos genes induzidos por LPS. As cinéticas de expressão desses mesmos genes induzidos por DENV-1 foram diferentes das cinéticas de expressão dos mesmos genes induzidos por DENV-4. A cinética de expressão dos mesmos genes induzidos por LPS em macrófagos murinos RAW 264.7 foi diferente da cinética de expressão desses genes induzidos por LPS em macrófagos murinos de medula óssea descrita por Hao e Baltimore (2009), refutando a hipótese do presente trabalho.

Para detectar vírus de RNA, o sistema imune inato deve ser capaz de detectar componentes virais conservados (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). Durante a infecção de células hospedeiras, estes vírus geram RNA dupla fita através de uma síntese de RNA dependente de RNA. Alguns vírus de DNA também produzem dsRNA durante o seu ciclo de vida. Assim, o dsRNA pode funcionar como um padrão molecular associado a patógenos (PAMP), sinalizando a infecção viral (JANEWAY & MEDZHITOV, 2002). Os PAMPs são reconhecidos pelo sistema imune inato, induzindo uma pronta resposta antiviral. O análogo sintético do dsRNA, ácido poliinosínico:policitidílico (polyI:C), induz o sistema imune inato a secretar as citocinas antivirais IFN- $\beta$  e IFN- $\alpha$ , assim como as citocinas que induzem uma resposta inflamatória. O RNA dupla fita (dsRNA), um intermediário da replicação viral, é detectado pelas RNA-helicases citoplasmáticas: gene induzido por ácido

retinóico I (RIG-I) (do inglês, *retinoic acid-inducible gene 1*) e gene 5 associado à diferenciação de melanoma (MDA-5, do inglês, *melanoma differentiation-associated gene 5*), bem como pelo receptor do tipo toll 3 (TLR3, do inglês, *toll-like receptor-3*) (MEYLAN & TSCHOPP, 2006).

Existe uma trindade de receptores de reconhecimento padrão (PRRs, do inglês, *pattern recognition receptors*) utilizada pelo sistema imune inato para detectar patógenos. Entre eles estão os receptores do tipo toll (TLRs), receptores do tipo RIG-I (RLRs) e receptores do tipo NOD (NLRs) (CREAGH & O'NEILL, 2006). Todas as 3 famílias de sensores estão relacionadas com a resposta inata antiviral, sendo que os membros de cada família são capazes de reconhecer dsRNA viral, que é um PAMP e um forte indutor de ambas as respostas inata e adaptativa. As localizações celulares destes sensores de dsRNA diferem entre si; o TLR3 é endossômico, enquanto que os RLRs (RIG-I e MDA-5) e NLRs são citoplasmáticos (ALEXOPOULOU *et al.*, 2001; KATO *et al.*, 2008). Todos reconhecem dsRNA e induzem potencialmente respostas semelhantes contra o dsRNA.

TLR3 e as RNA-helicases interagem com diferentes PAMPs durante os eventos de sinalização induzidos pelo dsRNA. Entretanto, estas duas vias paralelas de reconhecimento viral convergem ao nível de fator regulador 3 de interferon (IRF3, do inglês, *IFN regulatory factor-3*). A fosforilação do IRF3 inicia a resposta antiviral, incluindo a ativação do interferon tipo I (IFN), genes estimulados por interferon (ISGs) e citocinas pró-inflamatórias (DE VEER *et al.*, 2001; YONEYAMA & FUJITA, 2007).

A via TLR3/TRIF pode ter um papel relevante *in vivo* quando polyI:C ou dsRNA viral atingem compartimentos endossomais apropriados. Este evento poderia ocorrer quando as células fagocitam o dsRNA liberado no espaço extracelular pelas células infectadas com o vírus que estão passando pelos processos de lise ou necrose, ou quando as células internalizam os vírus através de endocitose mediada por um receptor. Consistente com isso, a fagocitose de células infectadas com vírus ou células contendo dsRNA sintético potencializam apresentação de antígenos através da estimulação do TLR3 em células apresentadoras de antígenos (APCs) (SCHULZ *et al.*, 2005). O entendimento e a identificação de padrões moleculares que induzem a sinalização imune inata podem levar a estratégias antivirais específicas contra a infecção pelo vírus da dengue.

Neste presente trabalho, foi observado que a infecção de células RAW 264.7 por DENV-1 induziu uma expressão do gene do TNF- $\alpha$  menor do que o estímulo por LPS (1  $\mu$ g/ml). Além disso, ambos os grupos, infectado com DENV-1 e estimulado com LPS, apresentaram cinéticas de resposta de expressão deste gene muito semelhantes, com pico em 2 horas após a infecção ou estímulo. Neste caso, isto pode significar que este gene pode ser de expressão intermediária, uma vez que, foi sugerido que esse tipo de gene tem pico de expressão em torno de 2 horas após uma infecção com algum tipo de patógeno ou estímulo com LPS, sendo que para ambos os casos as cinéticas de expressão do gene do TNF são muito semelhantes (HAO & BALTIMORE, 2009). A infecção de células RAW 264.7 por DENV-4 e o estímulo por LPS (1 $\mu$ g/ml) induziu grande expressão do gene do TNF- $\alpha$ , com pico de expressão em 8 horas pós-infecção ou pós-estímulo. Neste caso, o gene apresentou uma expressão intermediária-tardia. Em ambos os casos a cinética de expressão foi muito semelhante entre si. Entretanto, em relação à infecção pelo DENV-1, a infecção pelo DENV-4 pareceu induzir uma maior de expressão do gene do TNF- $\alpha$ .

Alguns autores sugeriram que o estímulo com LPS induz grande expressão de genes de citocinas como TNF- $\alpha$  em macrófagos *in vitro* (GUHA & MACKMAN, 2001). Quanto à ordem temporal da cinética de expressão dos genes de citocinas em caso de infecção por DENV, as primeiras citocinas a terem os níveis aumentados são IL-2, IL-6, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , enquanto que as citocinas expressadas tardiamente são a IL-4 e a IL-10 (CHATURVEDI *et al.*, 2000). Alguns estudos relataram que células RAW 264.7 quando estimuladas com LPS por 2 horas, apresentaram aumento da expressão de CD14 e aumento da liberação de TNF- $\alpha$  (LICHTMAN *et al.*, 1998).

Neste presente trabalho, a infecção de células RAW 264.7 por DENV-1 induziu uma expressão do gene do IFN- $\beta$  muito menor do que o estímulo por LPS (1  $\mu$ g/ml). No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-1 observou-se um pequeno pico de expressão do gene do IFN- $\beta$ , próximo do nível basal. Já no grupo de células estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml), o pico de expressão do gene do IFN- $\beta$  se deu em 2 horas após o estímulo, mostrando uma ativação intermediária. Uma explicação para esta diferença é que um mesmo gene pode se comportar diferentemente em relação a diferentes indutores e a diferentes concentrações de um mesmo indutor.

Alguns autores sugeriram que outro interferon, o IFN- $\alpha$  limita a replicação do vírus da dengue no sistema nervoso central de camundongos (SHRESTA *et al.*, 2004). Outras pesquisas sugeriram que o DENV inibe a ação do IFN- $\alpha$ , através da redução da expressão do transdutor de sinal e ativador de transcrição 2 (STAT-2) (HO *et al.*, 2005; JONES *et al.*, 2005).

No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-4 observou-se picos de expressão do gene do IFN- $\beta$  em 2 e 24 horas pós-infecção. Isto poderia indicar que, em caso de infecção por DENV-4 este gene apresenta ativação intermediária e tardia.

Em relação à infecção por DENV-1, a infecção por DENV-4 induziu uma maior resposta de expressão do gene do IFN- $\beta$ . Além disso, em relação ao grupo estimulado com LPS (1  $\mu$ g/ml), o DENV-4 também induziu uma maior expressão deste gene. No grupo de células estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml), o pico de expressão do gene do IFN- $\beta$  se deu em 8 horas após o estímulo. Neste grupo, este gene apresentou uma ativação intermediária-tardia.

Foi relatado que o DENV induz resposta de IFN do tipo I, mesmo em células sem expressão de RIG-I ou MDA-5 (LOO *et al.*, 2008). O mesmo foi observado no vírus do oeste do Nilo (WNV, do inglês, *West Nile virus*) (FREDERICKSEN *et al.*, 2008), outro *Flavivirus*. O vírus da encefalite japonesa (JEV, do inglês, *Japanese encephalitis virus*) (CHANG *et al.*, 2006) e o vírus da hepatite C (HCV, do inglês, *hepatitis C virus*) (SUMPTER *et al.*, 2005), também da família *Flaviviridae*, por outro lado, são reconhecidos apenas por RIG-I. Estes resultados sugerem que os flavivírus, apesar das semelhanças genômicas e estratégias de replicação, são reconhecidos de forma diferente pelo hospedeiro. Apesar de ter a via de IFN ativada em resposta à infecção viral, vírus patogênicos desenvolveram formas de manipular o sistema de IFN para favorecer a sua sobrevivência na célula hospedeira. Alguns relatos sugeriram que o DENV pode antagonizar a via de IFN através das suas proteínas não-estruturais, como, NS2A, NS2B, NS4B e NS5 (ASHOUR *et al.*, 2009; MUNOZ-JORDAN, 2010).

Alguns estudos de células de carcinoma de pulmão infectadas com DENV-1 revelaram aumento de expressão de ambos os receptores (extracelulares e citoplasmáticos) de reconhecimento padrão; RIG-I, MDA-5 e TLR3. RIG-I e MDA-5 reconhecem o dsRNA no citoplasma (LI *et al.*, 2009). Foi relatado que estes sensores intracelulares de RNA detectaram a infecção por DENV em diferentes células. Os autores deste

mesmo relato sugeriram que estes sensores estão grupalmente envolvidos na indução efetiva de produção de IFN contra o DENV (NASIRUDEEN *et al.*, 2011).

Alguns estudos relataram que as células Huh-7 silenciadas para RIG-I e MDA-5 e macrófagos silenciados para TLR3 foram muito suscetíveis à infecção pelo DENV quando comparadas às células que apresentavam expressão desses sensores de RNA viral. Quando as células foram silenciadas para apenas RIG-I e MDA-5, mas não para o TLR3, ocorreu uma produção substancial de IFN- $\beta$ . Esses estudos indicaram que os sensores intracelulares de RNA viral (RIG-I, MDA5 e TLR3) são ativados na infecção por DENV e são essenciais para a defesa do hospedeiro contra o vírus. Quando transfectados individualmente, RIG-I e MDA-5 não foram capazes de suprimir eficientemente a replicação do DENV, mas induziram altos níveis de expressão do gene do IFN- $\beta$ . Estes resultados sugerem que RIG-I e MDA5 medeiam sinergicamente uma resposta antiviral durante a infecção pelo DENV (NASIRUDEEN *et al.*, 2011).

O silenciamento de TLR3 com RNA de interferência (iRNA) em células com baixa expressão de RIG-I e MDA-5, resultou numa maior infecção viral e a superexpressão de TLR3 inibiu significativamente a infecção por DENV, através da indução de altos níveis de expressão do gene do IFN- $\beta$  (NASIRUDEEN *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que o MDA-5 foi essencial para as respostas de IFN tipo I de células dendríticas derivadas da medula óssea e macrófagos ao polyI:C (GITLIN *et al.*, 2006), que se comporta como dsRNA viral. Em contraste, a via TLR3-TRIF induziu respostas ao polyI:C em macrófagos peritoneais (GITLIN *et al.*, 2006).

Neste presente trabalho, a infecção de células RAW 264.7 por DENV-1 induziu uma pequena expressão do gene da IL-10. Neste caso, os níveis de expressão deste gene ficaram próximos dos níveis basais. No grupo de células estimuladas com LPS (1  $\mu$ g/ml), ocorreu grande expressão do gene da IL-10, sendo que o pico de expressão do gene da IL-10 se deu em 8 horas após o estímulo. Portanto, a cinética de expressão do gene da IL-10 quando induzido por DENV-1 foi diferente de quando induzido por LPS.

No caso da infecção de células RAW 264.7 por DENV-4 ocorreu forte indução da expressão do gene da IL-10 com pico em 24 horas após a infecção. Em relação à infecção pelo DENV-1, o DENV-4 induziu grande expressão do gene da IL-10, e o pico se deu em 24 h.p.i. No

grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu uma maior expressão do gene da IL-10 do que no grupo de células infectadas pelo DENV-4, ocorrendo picos em 2 e 24 horas após o estímulo. Este gene apresentou ativação tardia no grupo de células infectadas com DENV-4 e, por outro lado, ativações intermediária e tardia no grupo estimulado com LPS (1 µg/ml).

Neste presente trabalho, a infecção de células RAW 264.7 por DENV-1 induziu pouca expressão do gene da IL-6, embora um pouco maior do que os níveis basais do controle negativo em zero hora, sem infecção. O estímulo destas células por LPS (1 µg/ml) induziu altos níveis de expressão do mesmo gene. No grupo de células infectadas com o DENV-1 houve um pequeno pico de expressão do gene da IL-6 em meia hora após a infecção, indicando que este gene pode ter uma expressão precoce. No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu grande expressão do gene da IL-6, ocorrendo um pico de expressão do gene da IL-6 em 8 horas após o estímulo, indicando uma expressão tardia deste gene. Alguns autores sugeriram que o estímulo com LPS induz grande expressão de genes de citocinas como IL-6 em macrófagos *in vitro* (GUHA & MACKMAN, 2001). Alguns autores sugerem que a expressão dos genes de IL6 e IL-10 está relacionada com uma resposta do tipo Th2 (CHATURVEDI *et al.*, 2000).

Neste presente trabalho, foi observado que no grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-4 os níveis de expressão do gene da IL-6 foram muito altos, inclusive maiores do que os níveis de expressão do mesmo gene em células estimuladas com LPS (1 µg/ml) e em células infectadas pelo DENV-1. O pico de expressão do gene da IL-6 em células infectadas com o DENV-4 ocorreu em 2 horas após a infecção, indicando que este gene, neste caso, apresentou expressão intermediária.

Ainda neste trabalho, a infecção de RAW 264.7 por DENV-1 levou a uma expressão menor de IL-12p40 em relação ao grupo controle sem infecção ou estímulo, sendo os níveis de expressão próximos aos basais. Esse resultado condiz com os achados de outros autores de que não houve uma resposta significativa de IL-12p40 em pacientes com dengue quando comparada com a resposta dos grupos controles (JUFFRIE *et al.*, 2002). Além disso, outros autores observaram que em camundongos, durante a infecção por DENV, a IL-12 age junto com a IL-18, contribuindo para a produção ótima de IFN-γ e consequente indução de NOS2, levando à defesa do hospedeiro contra o DENV (FAGUNDES *et al.*, 2011).

No grupo de células RAW 264.7 infectadas com DENV-4 os níveis de expressão do gene da IL-12p40 foram maiores do que os níveis de expressão do mesmo gene em células estimuladas com LPS (1 µg/ml) e em células infectadas pelo DENV-1. O pico de expressão em células infectadas com o DENV-4 ocorreu em 24 horas após a infecção, indicando, neste caso, expressão tardia. No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml) o pico de expressão do gene da IL-12p40 se deu em 8 horas após o estímulo, indicando uma expressão intermediária-tardia deste gene.

A IL-12 tem um efeito profundo sobre a regulação positiva de células Th1 e de citocinas derivadas de uma resposta do tipo Th1, enquanto que, a ausência da mesma desloca o equilíbrio para uma resposta do tipo Th2. A IL-12 tem sido associada com a limpeza do vírus, recuperação do hospedeiro e proteção em um grande número de infecções virais (CHATURVEDI *et al.*, 2000). De acordo com essas informações, pode-se sugerir que, como a IL-12 favorece a defesa do hospedeiro contra o vírus, este último, poderia induzir expressão reduzida desta citocina, de modo que isso não levaria à sua destruição pelas defesas do hospedeiro. Essa seria uma explicação plausível para o resultado de pouca expressão do gene da IL-12p40 em células RAW 264.7 infectadas pelo DENV-1 observado neste presente trabalho.

Outros estudos sugeriram que indivíduos com maior expressão de receptor DC-SIGN (CD209) na superfície de macrófagos, apresentaram altos níveis de IL-12p40, durante a infecção por DENV (WANG *et al.*, 2011). Outros autores sugeriram que a produção de IL-12p40 parece ser deficiente em crianças com DHF e que a IL-10 é um potente regulador da expressão do gene da IL-12, e que as cinéticas de expressão de ambos sugerem que quando os níveis de IL-10 aumentam, os níveis de IL-12 decrescem (GREEN *et al.*, 1999).

No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu pouca expressão do gene da IL-12p40, em relação ao grupo controle negativo em zero hora, ocorrendo pequenos picos de expressão do gene da IL-12p40 em 2 e 24 horas após o estímulo, indicando uma expressão intermediária e tardia deste gene.

Outros mediadores da resposta inflamatória foram encontrados em pacientes com infecção aguda pelo DENV, como por exemplo, a enzima óxido nítrico sintase induzida (NOS2, do inglês, *inducible nitric oxide synthase*). Neste presente trabalho, os níveis de expressão do gene da NOS2 em células RAW 264.7 infectadas com DENV-1 foram muito



menores do que os níveis de expressão do mesmo gene no grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml). Entretanto, ambos os grupos apresentaram cinéticas de expressão muito semelhantes, com picos de expressão do gene da NOS2 em 8 e aumentando em 48 horas após a infecção ou o estímulo. Portanto, em ambos os casos, este gene seria de expressão tardia.

Neste presente trabalho, foi observado que no grupo de células infectadas com DENV-4 os níveis de expressão do gene da NOS2 foram muito altos e atingiram pico em 24 horas após a infecção, indicando, neste caso, uma expressão tardia deste gene. Além disso, a infecção por DENV-4 induziu uma expressão do gene da NOS2 muito maior do que a infecção por DENV-1. No grupo de células estimuladas com LPS (1 µg/ml), ocorreu expressão exacerbada do gene da NOS2, em relação ao grupo controle negativo em zero hora, e em relação ao grupo infectado com DENV-4. No grupo estimulado com LPS (1 µg/ml), os picos de expressão do gene da NOS2 ocorreram em 8 horas após o estímulo indicando uma expressão intermediária-tardia deste gene.

Alguns autores sugeriram que o DENV-1 foi suscetível ao óxido nítrico produzido pelos monócitos humanos infectados (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005). Esses mesmos autores sugeriram que quando as células-alvo (por exemplo, monócitos e macrófagos) são infectadas, o DENV-1 induz uma expressão progressiva da enzima NOS2, indicando que o NO deve ser produzido durante a infecção *in vitro*, assim como é produzido na infecção *in vivo*. Quanto à cinética de expressão do gene da NOS2, foi observado que os seus níveis aumentam em 6 dias após a infecção, se comparados aos seus níveis em 3 dias após a infecção e coincidem com o decréscimo na quantidade viral. Isso condiz com a hipótese de que as células produtoras de NOS2 promovem um efeito inibidor no vírus diretamente ou através da produção de NO, ou ainda, por outros mecanismos induzidos por vírus durante a ativação dos monócitos, como a produção de IFN- $\alpha$  (NEVES-SOUZA *et al.*, 2005).

Outros autores descreveram ainda, níveis reduzidos de óxido nítrico (NO) relacionados com o aumento dos níveis de IL-10 em pacientes com dengue grave (SIMMONS *et al.*, 2007). Esses resultados contribuem para um papel protetor do óxido nítrico, sendo esse mediador associado com quadros clínicos brandos de DF (VALERO *et al.*, 2002). Outros autores sugeriram que o estímulo com LPS induz grande expressão de genes de citocinas como NOS2 (anteriormente

denominada iNOS) em macrófagos *in vitro* (GUHA & MACKMAN, 2001).

Os receptores removedores de classe A (SR-As, do inglês, *class A scavenger receptors*) são importantes sensores de PAMPs bacterianos. SR-As expressados por macrófagos podem se ligar ao LPS (PLATT & GORDON, 2001), assim como medeiam a fagocitose de bactérias (PEISER *et al.*, 2002). Os SR-As medeiam também a internalização dos ligantes e subsequente estimulação das vias intracelulares. Estes receptores medeiam inclusive a captação de antígenos para a apresentação pelo complexo MHC em células T (NICOLETTI *et al.*, 1999). Outros autores observaram que a liberação de TNF- $\alpha$  por células RAW 264.7 mediadas por SR-As pode ser induzida por polyI:C (COLLER & PAULNOCK, 2001).

O TLR4 é expresso em uma ampla variedade de células humanas e serve como receptor para ligantes endógenos e exógenos (AKIRA *et al.*, 2001; BEG, 2002; ZAREMBER & GODOWSKI, 2002). Este receptor transmembranar é a molécula de reconhecimento primário para o LPS de bactérias gram-negativas (MEDZHITOV *et al.*, 1997; POLTORAK *et al.*, 1998; QURESHI *et al.*, 1999). A proteína ligante de LPS (LBP, do inglês, *LPS binding protein*) catalisa a transferência do LPS para a membrana ou para o CD14 solúvel (TOBIAS *et al.*, 1995), que, por sua vez, media o reconhecimento do LPS pelo TLR4. As funções principais do CD14 e do TLR4 na sinalização do LPS são enfatizados pelo fato de que camundongos deficientes nestes receptores são altamente resistentes ao choque por endotoxina (HAZIOT *et al.*, 1996; POLTORAK *et al.*, 1998). No curso da sepse, a neutralização física (FREUDENBERG & GALANOS, 1985) e a internalização do LPS por células imunes são importantes para a sua detoxificação.

Após a endocitose, o LPS é biologicamente desativado por enzimas específicas (MUNFORD & HALL, 1986). Várias moléculas de superfície celular podem se ligar ao LPS. Em células CD14<sup>+</sup>, o LPS é internalizado através de mecanismos dependentes do receptor CD14 (SCHIFF *et al.*, 1997; KITCHENS *et al.*, 1998; POUSSIN *et al.*, 1998), enquanto que, em células CD14 negativas, como células endoteliais e epiteliais, receptores *scavenger* estão relacionados à remoção do LPS (HAMPTON *et al.*, 1991; SHNYRA & LINDBERG, 1995; VISHNYAKOVA *et al.*, 2003). Publicações recentes sugerem que há internalização e transporte intracelular do LPS dependentes do TLR-4

(THIEBLEMONT & WRIGHT, 1997; LATZ *et al.*, 2002; SUZUKI *et al.*, 2003).

Alguns autores confirmaram a captação de LPS dependente de CD14 (SCHIFF *et al.*, 1997; KITCHENS *et al.*, 1998; POUSSIN *et al.*, 1998; LATZ *et al.*, 2002) e sugeriram que os movimentos intracelulares do TLR4 podem ser transportados através da membrana lipídica juntamente com o CD14 internalizado (TRIANTAFILOU *et al.*, 2002). O TLR4 não está envolvido nos mecanismos de captação celular do LPS. Em células CD14<sup>+</sup>, o LPS é predominantemente captado por vias mediadas por CD14, enquanto que, em células endoteliais CD14<sup>-</sup>, existe um papel para vias dependentes dos receptores *scavenger* (DUNZENDORFER *et al.*, 2004).

Em todos os grupos de infecção pelo DENV-1 em que houve baixa expressão dos genes das citocinas, a MOI do vírus de 0,1 utilizada foi muito baixa para induzir uma grande expressão de cada gene. Esta explicação poderia ser relacionada com as seguintes citocinas: TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10 e IL-6. Os níveis de expressão dos genes de todas as citocinas e da enzima NOS2 induzidos pelo DENV-4 foram muito maiores do que os níveis de expressão induzidos pelo DENV-1. Isso pode sugerir que a MOI do DENV-4, apesar de desconhecida, pode ter sido muito maior do que a do DENV-1.

Alguns estudos sugeriram uma correlação entre o sorotipo viral e a gravidade da doença. Alguns autores sugeriram que o DENV-4 causa doença menos grave em infecções primárias (NISALAK *et al.*, 2003). Apesar da baixa prevalência do DENV-4, ele foi responsável por 10% dos casos de DHF em crianças, sendo que a maioria dos casos estava associada a uma infecção secundária pelo DENV (NISALAK *et al.*, 2003). Além disso, o DENV-4 requer a ação de fatores imunológicos heterólogos, como por exemplo, de anticorpos potencializadores da infecção (ADE) para infectar as células (KLUNGTHONG *et al.*, 2004). Alguns autores sugeriram que casos de dengue hemorrágica causados por DENV-2 e DENV-4 estão relacionados com infecções secundárias, e não com infecções primárias. Eles sugeriram ainda que o DENV-1 e o DENV-3 foram mais patogênicos quando não ocorreram infecções prévias por outros sorotipos (FRIED *et al.*, 2010). O DENV-2 e o DENV-3 foram capazes de induzir a dengue hemorrágica em infecções secundárias do que o DENV-4 (FRIED *et al.*, 2010).

Como explicitado anteriormente, autores como Hao e Baltimore (2009) e Tullai e colaboradores (2007), salientam a

importância do estudo da expressão de grupos de genes envolvidos na resposta inflamatória em ordem temporal. Esses estudos são essenciais para o entendimento da cinética de expressão dos genes e da sua relação com a ordem dos eventos inflamatórios decorrentes de uma infecção por algum tipo de patógeno ou estímulo por algum outro indutor. Dessa forma, o entendimento da cinética de expressão dos genes de todas as citocinas e proteínas envolvidas na resposta inflamatória decorrente da infecção pelos diferentes sorotipos do DENV em diferentes tipos e linhagens celulares ainda precisa ser mais aprofundado.

O padrão de ordem temporal de expressão destes genes ainda precisa ser bem estabelecido. Este seria um conhecimento importante, por exemplo, para a produção de fármacos que possam interferir na ativação dos genes das citocinas, na liberação ou função destes mediadores químicos em tempos específicos após a infecção pelo DENV.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos mostraram que ocorreram variações na cinética e níveis de expressão dos genes das citocinas IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-12p40 e da enzima NOS2 em resposta à infecção pelo DENV-1, à infecção pelo DENV-4, ou em resposta ao estímulo com LPS.

- Dentre as citocinas cujos genes apresentaram expressão precoce estão: IFN- $\beta$  e IL-6.

- Dentre as citocinas cujos genes apresentaram expressão intermediária estão: TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6 e IL-12p40.

- Dentre as citocinas cujos genes apresentaram expressão intermediária-tardia estão: TNF- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IL-10, IL-6, IL-12p40 e a enzima NOS2.

- Dentre as citocinas cujos genes apresentaram expressão tardia estão: IFN- $\beta$ , IL-10, IL-12p40 e a enzima NOS2.

No caso da infecção de células RAW 264.7 com o DENV-4, os níveis de expressão dos genes de todas essas citocinas e enzima foram maiores do que no caso da infecção pelo DENV-1. Como a MOI do DENV-4 é desconhecida, é possível que essa diferença deva-se a uma maior MOI do DENV-4 em relação ao DENV-1.

Seria necessária a realização de mais estudos com outras metodologias para avaliar as diferenças de cinéticas de expressão dos genes das citocinas envolvidas na resposta inflamatória à infecção pelo DENV.



## **7. PERSPECTIVAS**

Dentre as perspectivas, estaria o aprofundamento do conhecimento sobre a cinética de expressão dos genes envolvidos na resposta inflamatória à infecção por cada sorotipo do vírus da dengue. Dessa forma, outros estudos poderiam ser feitos testando-se infecção com valores variados de MOI viral, além dos quatro sorotipos do DENV, linhagens de células diferentes e amplificação dos genes de outras citocinas e proteínas envolvidas na resposta inflamatória contra a infecção por estes vírus. Assim, seria possível observar se estas variações levam a grandes diferenças na ordem temporal de expressão dos genes e na quantificação da expressão dos mesmos.





## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRA, S.; TAKEDA, K.; KAISHO, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. **Nature Immunology** 2(8): 675-680, 2001.
- ALEXOPOULOU, L., *et al.* Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. **Nature** 413(6857): 732-738, 2001.
- ANDERSON, P. Intrinsic mRNA stability helps compose the inflammatory symphony. **Nature Immunology** 10(3): 233-234, 2009.
- ANDERSON, R., *et al.* Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. **The Journal of Virology** 71(6): 4226-4232, 1997.
- ASHOUR, J., *et al.* NS5 of dengue virus mediates STAT2 binding and degradation. **The Journal of Virology** 83(11): 5408-5418, 2009.
- AVILA-AGUERO, M. L., *et al.* Systemic host inflammatory and coagulation response in the Dengue virus primo-infection. **Cytokine** 27(6): 173-179, 2004.
- AVIRUTNAN, P., *et al.* Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. **The Journal of Immunology** 161(11): 6338-6346, 1998.
- AZEREDO, E. L., *et al.* NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. **Clinical and Experimental Immunology** 143(2): 345-356, 2006.

- BARTHOLOMEUSZ, A.; THOMPSON, P. Flaviviridae polymerase and RNA replication. **The Journal of Viral Hepatitis** 6(4): 261-270, 1999.
- BASU, A.; CHATURVEDI, U. C. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 53(3): 287-299, 2008.
- BECQUART, P., *et al.* Acute dengue virus 2 infection in Gabonese patients is associated with an early innate immune response, including strong interferon alpha production. **BMC Infectious Diseases** 10: 356, 2010.
- BEG, A. A. Endogenous ligands of Toll-like receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses. **Trends in Immunology** 23(11): 509-512, 2002.
- BRAGA, E. L., *et al.* Detection of circulant tumor necrosis factor-alpha, soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-gamma in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 96(2): 229-232, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Nota Técnica Situação Epidemiológica da Dengue**. Brasília, 28 de março de 2008. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_dengue\\_2803.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_dengue_2803.pdf)>. Acesso em: 17 Maio 2011.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica Dengue**. Caderno 9. 7ª Edição. Brasília, 2009. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve\\_7ed\\_web\\_atual\\_dengue.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_dengue.pdf)>. Acesso em: 21 Julho 2012.
- BRESSANELLI, S., *et al.* Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. **The Embo Journal** 23(4): 728-738, 2004.

- BROWN, M. G., *et al.* Dengue virus infection of mast cells triggers endothelial cell activation. **The Journal of Virology** 85(2): 1145-1150, 2011.
- CAREY, D. E. Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? **The Journal of the History of Medicine and Allied Sciences** 26(3): 243-262, 1971.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. MMWR. **Aedes albopictus Introduction into Continental Africa, 1991**; 40(48): 836-838. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/00015682.htm>>. Acesso em: 16 Maio 2011.
- CHAKRAVARTI, A.; KUMARIA, R. Circulating levels of tumour necrosis factor-alpha & interferon-gamma in patients with dengue & dengue haemorrhagic fever during an outbreak. **Indian Journal of Medical Research** 123(1): 25-30, 2006.
- CHANG, T. H.; LIAO, C. L.; LIN, Y. L. Flavivirus induces interferon-beta gene expression through a pathway involving RIG-I-dependent IRF-3 and PI3K-dependent NF-kappaB activation. **Microbes and Infection** 8(1): 157-171, 2006.
- CHATURVEDI, U.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Dengue and dengue haemorrhagic fever: implications of host genetics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 47(2): 155-166, 2006.
- CHATURVEDI, U. C., *et al.* Cytokine cascade in dengue hemorrhagic fever: implications for pathogenesis. **FEMS Immunology Medical Microbiology** 28(3): 183-188, 2000.
- CHATURVEDI, U. C., *et al.* Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocyte cultures. **The Journal of Medical Virology** 59(3): 335-340, 1999.

- CHATURVEDI, U. C.; NAGAR, R.; SHRIVASTAVA, R. Macrophage and dengue virus: friend or foe? **Indian Journal of Medical Research** 124(1): 23-40, 2006.
- CHEN, L. C., *et al.* Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 74(1): 142-147, 2006.
- CHIEN, J.; ONG, A.; LOW, S. Y. An unusual complication of dengue infection. **Singapore Medical Journal** 49(12): e340-342, 2008.
- CHIEN, L. J., *et al.* Development of real-time reverse transcriptase PCR assays to detect and serotype dengue viruses. **The Journal of Clinical Microbiology** 44(4): 1295-1304, 2006.
- CLYDE, K.; KYLE, J. L.; HARRIS, E. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. **The Journal of Virology** 80(23): 11418-11431, 2006.
- COLLER, S. P.; PAULNOCK, D. M. Signaling pathways initiated in macrophages after engagement of type A scavenger receptors. **Journal of Leukocyte Biology** 70(1): 142-148, 2001.
- CREAGH, E. M.; O'NEILL, L. A. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity. **Trends in Immunology** 27(8): 352-357, 2006.
- DE KRUIF, M. D., *et al.* Differential gene expression changes in children with severe dengue virus infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 2(4): e215, 2008.
- DE VEER, M. J., *et al.* Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. **Journal of Leukocyte Biology** 69(6): 912-920, 2001.
- DEJNIRATTISAI, W., *et al.* Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science** 328(5979): 745-748, 2010.

- DEUBEL, V., *et al.* Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood. **The Journal of Virological Methods** 30(1): 41-54, 1990.
- DIAMOND, M. S., *et al.* Modulation of Dengue virus infection in human cells by alpha, beta, and gamma interferons. **The Journal of Virology** 74(11): 4957-4966, 2000.
- DUANGCHINDA, T., *et al.* Immunodominant T-cell responses to dengue virus NS3 are associated with DHF. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 107(39): 16922-16927, 2010.
- DUNZENDORFER, S., *et al.* TLR4 is the signaling but not the lipopolysaccharide uptake receptor. **The Journal of Immunology** 173(2): 1166-1170, 2004.
- FAGUNDES, C. T., *et al.* IFN-gamma production depends on IL-12 and IL-18 combined action and mediates host resistance to dengue virus infection in a nitric oxide-dependent manner. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 5(12): e1449, 2011.
- FIELDS, B. N.; KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. Philadelphia ; London, Wolters Kluwer Health / Lippincott Williams & Wilkins, 2007.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Dengue in Brazil: Past, Present and Future Perspectives. **World Health Organization Bulletin, Nova Delhi, India** 27: 25-33, 2003.
- FREDERICKSEN, B. L., *et al.* Establishment and maintenance of the innate antiviral response to west nile virus involves both RIG-I and MDA5 signaling through IPS-1. **The Journal of Virology** 82(2): 609-616, 2008.
- FREUDENBERG, M. A.; GALANOS, C. Alterations in rats in vivo of the chemical structure of lipopolysaccharide from Salmonella

abortus equi. **European Journal of Biochemistry** 152(2): 353-359, 1985.

FRIED, J. R., *et al.* Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 4(3): e617, 2010.

GAGNON, S. J.; ENNIS, F. A.; ROTHMAN, A. L. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. **The Journal of Virology** 73(5): 3623-3629, 1999.

GITLIN, L., *et al.* Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic:polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA** 103(22): 8459-8464, 2006.

GOMES-RUIZ, A. C., *et al.* SYBR green and TaqMan real-time PCR assays are equivalent for the diagnosis of dengue virus type 3 infections. **The Journal of Medical Virology** 78(6): 760-763, 2006.

GRANDVAUX, N., *et al.* The interferon antiviral response: from viral invasion to evasion. **Current Opinion in Infectious Diseases** 15(3): 259-267, 2002.

GREEN, S., *et al.* Elevated plasma interleukin-10 levels in acute dengue correlate with disease severity. **The Journal of Medical Virology** 59(3): 329-334, 1999.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever. **Clinical Microbiology Reviews** 11(3): 480-496, 1998.

GUBLER, D. J.; KUNO, G. **Dengue and dengue hemorrhagic fever.** Wallingford, CAB International, 1997.

- GUHA, M.; MACKMAN, N. LPS induction of gene expression in human monocytes. **Cellular Signalling** 13(2): 85-94, 2001.
- GULATI, S.; MAHESHWARI, A. Atypical manifestations of dengue. **Tropical Medicine & International Health** 12(9): 1087-1095, 2007.
- GUZMAN, M. G., *et al.* Fatal dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1997. **The International Journal of Infectious Diseases** 3(3): 130-135, 1999.
- GUZMAN, M. G., *et al.* Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**: S7-S16, 2010.
- GUZMAN, M. G.; KOURI, G. Advances in dengue diagnosis. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology** 3(6): 621-627, 1996.
- GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. **International Journal of Infectious Diseases** 8(2): 69-80, 2004.
- HALSTEAD, S. B. Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. **Science** 239(4839): 476-481, 1988.
- HALSTEAD, S. B. The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. **World Health Statistics Quarterly** 45(2-3): 292-298, 1992.
- HALSTEAD, S. B. Dengue in the Americas and Southeast Asia: Do they differ? **Revista Panamericana De Salud Publica-Pan American Journal of Public Health** 20(6): 407-415, 2006.
- HALSTEAD, S. B. **Dengue**. London, Imperial College Press, 2008.
- HALSTEAD, S. B., *et al.* Intrinsic antibody-dependent enhancement of microbial infection in macrophages: disease regulation by immune complexes. **The Lancet Infectious Diseases** 10(10): 712-722, 2010.

- HALSTEAD, S. B.; OROURKE, E. J. Dengue Viruses and Mononuclear Phagocytes .1. Infection Enhancement by Non-Neutralizing Antibody. **Journal of Experimental Medicine** 146(1): 201-217, 1977.
- HAMMON, W. M.; RUDNICK, A.; SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. **Science** 131(3407): 1102-1103, 1960.
- HAMPTON, R. Y., *et al.* Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors. **Nature** 352(6333): 342-344, 1991.
- HAO, S.; BALTIMORE, D. The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. **Nature Immunology** 10(3): 281-288, 2009.
- HAZIOT, A., *et al.* Resistance to endotoxin shock and reduced dissemination of gram-negative bacteria in CD14-deficient mice. **Immunity** 4(4): 407-414, 1996.
- HENCHAL, E. A.; PUTNAK, J. R. The Dengue Viruses. **Clinical Microbiology Reviews** 3(4): 376-396, 1990.
- HO, L. J., *et al.* Dengue virus type 2 antagonizes IFN-alpha but not IFN-gamma antiviral effect via down-regulating Tyk2-STAT signaling in the human dendritic cell. **The Journal of Immunology** 174(12): 8163-8172, 2005.
- HOLLAND, J., *et al.* Rapid Evolution of Rna Genomes. **Science** 215(4540): 1577-1585, 1982.
- HOLMES, E. C.; TWIDDY, S. S. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. **Infection, Genetics and Evolution** 3(1): 19-28, 2003.
- HUANG, Y. H., *et al.* Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 63(1-2): 71-75, 2000.



- HUNG, N. T., *et al.* Association between sex, nutritional status, severity of dengue hemorrhagic fever, and immune status in infants with dengue hemorrhagic fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 72(4): 370-374, 2005.
- JAIYEN, Y., *et al.* Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. **Microbiology and Immunology** 53(8): 442-450, 2009.
- JANEWAY, C. A., JR.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annual Review of Immunology** 20: 197-216, 2002.
- JONES, M., *et al.* Dengue virus inhibits alpha interferon signaling by reducing STAT2 expression. **The Journal of Virology** 79(9): 5414-5420, 2005.
- JOSHI, V.; MOURYA, D. T.; SHARMA, R. C. Persistence of dengue-3 virus through transovarial transmission passage in successive generations of *Aedes aegypti* mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 67(2): 158-161, 2002.
- JUFFRIE, M., *et al.* Inflammatory mediators in dengue virus infection in children: interleukin-6 and its relation to C-reactive protein and secretory phospholipase A2. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 65(1): 70-75, 2001.
- JUFFRIE, M., *et al.* Inflammatory Mediators in Dengue Virus Infection: Circulating Interleukin-12 and Interferon- $\gamma$ . **Dengue Bulletin** 26: 144-154, 2002.
- KATO, H., *et al.* Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. **Journal of Experimental Medicine** 205(7): 1601-1610, 2008.
- KAUTNER, I.; ROBINSON, M. J.; KUHNLE, U. Dengue virus infection: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation,

diagnosis, and prevention. **The Journal of Pediatrics** 131(4): 516-524, 1997.

KING, C. A.; ANDERSON, R.; MARSHALL, J. S. Dengue virus selectively induces human mast cell chemokine production. **The Journal of Virology** 76(16): 8408-8419, 2002.

KITCHENS, R. L.; WANG, P.; MUNFORD, R. S. Bacterial lipopolysaccharide can enter monocytes via two CD14-dependent pathways. **The Journal of Immunology** 161(10): 5534-5545, 1998.

KLUNGTHONG, C., *et al.* The molecular epidemiology of dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. **Virology** 329(1): 168-179, 2004.

KUBELKA, C. F., *et al.* Analysis of tumor necrosis factor-alpha serum level in Brazilian patients with Dengue-2. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 90(6): 741-742, 1995.

KUNO, G.; BAILEY, R. E. Cytokine responses to dengue infection among Puerto Rican patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 89(2): 179-182, 1994.

KUNO, G., *et al.* Comparative sensitivity of three mosquito cell lines for isolation of dengue viruses. **World Health Organization Bulletin** 63(2): 279-286, 1985.

KURANE, I.; ENNIS, F. A. Cytokines in Dengue Virus-Infections - Role of Cytokines in the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic-Fever. **Seminars in Virology** 5(6): 443-448, 1994.

LANCIOTTI, R. S., *et al.* Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. **The Journal of Clinical Microbiology** 30(3): 545-551, 1992.

LATZ, E., *et al.* Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14

- complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. **The Journal of Biological Chemistry** 277(49): 47834-47843, 2002.
- LI, X., *et al.* The RIG-I-like receptor LGP2 recognizes the termini of double-stranded RNA. **The Journal of Biological Chemistry** 284(20): 13881-13891, 2009.
- LIBRATY, D. H., *et al.* Differing influences of virus burden and immune activation on disease severity in secondary dengue-3 virus infections. **The Journal of Infectious Diseases** 185(9): 1213-1221, 2002.
- LIBRATY, D. H., *et al.* Human dendritic cells are activated by dengue virus infection: enhancement by gamma interferon and implications for disease pathogenesis. **The Journal of Virology** 75(8): 3501-3508, 2001.
- LICHTMAN, S. N.; WANG, J.; LEMASTERS, J. J. LPS receptor CD14 participates in release of TNF-alpha in RAW 264.7 and peritoneal cells but not in kupffer cells. **American Journal of Physiology** 275(1 Pt 1): G39-46, 1998.
- LIN, Y. W., *et al.* Virus replication and cytokine production in dengue virus-infected human B lymphocytes. **The Journal of Virology** 76(23): 12242-12249, 2002.
- LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Flaviviruses: Structure, Replication and Evolution** 59: 23-+, 2003.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods** 25(4): 402-408, 2001.
- LOO, Y. M., *et al.* Distinct RIG-I and MDA5 signaling by RNA viruses in innate immunity. **The Journal of Virology** 82(1): 335-345, 2008.

- LUHN, K., *et al.* Increased frequencies of CD4+ CD25(high) regulatory T cells in acute dengue infection. **The Journal of Experimental Medicine** 204(5): 979-985, 2007.
- MALAVIGE, G. N., *et al.* Dengue viral infections. **Postgraduate Medical Journal** 80(948): 588-601, 2004.
- MANGADA, M. M., *et al.* Dengue-specific T cell responses in peripheral blood mononuclear cells obtained prior to secondary dengue virus infections in Thai schoolchildren. **The Journal of Infectious Diseases** 185(12): 1697-1703, 2002.
- MCBRIDE, W. J.; BIELEFELDT-OHMANN, H. Dengue viral infections; pathogenesis and epidemiology. **Microbes and Infection** 2(9): 1041-1050, 2000.
- MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY, C. A., JR. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature** 388(6640): 394-397, 1997.
- MEYLAN, E.; TSCHOPP, J. Toll-like receptors and RNA helicases: two parallel ways to trigger antiviral responses. **Molecular Cell** 22(5): 561-569, 2006.
- MODIS, Y., *et al.* Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. **Nature** 427(6972): 313-319, 2004.
- MONGKOLSAPAYA, J., *et al.* Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. **Nature Medicine** 9(7): 921-927, 2003.
- MONGKOLSAPAYA, J., *et al.* T cell responses in dengue hemorrhagic fever: are cross-reactive T cells suboptimal? **The Journal of Immunology** 176(6): 3821-3829, 2006.
- MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology** 3(1): 13-22, 2005.

- MUNFORD, R. S.; HALL, C. L. Detoxification of bacterial lipopolysaccharides (endotoxins) by a human neutrophil enzyme. **Science** 234(4773): 203-205, 1986.
- MUNOZ-JORDAN, J. L. Subversion of interferon by dengue virus. **Current Topics in Microbiology and Immunology** 338: 35-44, 2010.
- MUNOZ-JORDAN, J. L., *et al.* Inhibition of alpha/beta interferon signaling by the NS4B protein of flaviviruses. **The Journal of Virology** 79(13): 8004-8013, 2005.
- NASIRUDEEN, A. M., *et al.* RIG-I, MDA5 and TLR3 synergistically play an important role in restriction of dengue virus infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 5(1): e926, 2011.
- NATARAJAN, S. NS3 protease from flavivirus as a target for designing antiviral inhibitors against dengue virus. **Genetics and Molecular Biology** 33(2): 214-219, 2010.
- NAWA, M., *et al.* Development of dengue IgM-capture enzyme-linked immunosorbent assay with higher sensitivity using monoclonal detection antibody. **The Journal of Virological Methods** 92(1): 65-70, 2001.
- NEVES-SOUZA, P. C., *et al.* Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection. **BMC Infectious Diseases** 5: 64, 2005.
- NGUYEN, T. H., *et al.* Dengue hemorrhagic fever in infants: a study of clinical and cytokine profiles. **The Journal of Infectious Diseases** 189(2): 221-232, 2004.
- NICOLETTI, A., *et al.* The macrophage scavenger receptor type A directs modified proteins to antigen presentation. **European Journal of Immunology** 29(2): 512-521, 1999.

- NISALAK, A., *et al.* Serotype-specific dengue virus circulation and dengue disease in Bangkok, Thailand from 1973 to 1999. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 68(2): 191-202, 2003.
- NOISAKRAN, S., *et al.* Cells in dengue virus infection in vivo. **Advances in Virology** 2010: 164878, 2010.
- NOISAKRAN, S.; PERNG, G. C. Alternate hypothesis on the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever (DHF)/dengue shock syndrome (DSS) in dengue virus infection. **Experimental Biology and Medicine (Maywood)** 233(4): 401-408, 2008.
- NOMAGUCHI, M., *et al.* De novo synthesis of negative-strand RNA by Dengue virus RNA-dependent RNA polymerase in vitro: nucleotide, primer, and template parameters. **The Journal of Virology** 77(16): 8831-8842, 2003.
- OMS. Organización Mundial de La Salud. **Centro de prensa: Dengue y dengue hemorrágico**. Nota descriptiva. Marzo de 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/>>. Acesso em: 30 Março 2011.
- PALMER, D. R., *et al.* Differential effects of dengue virus on infected and bystander dendritic cells. **The Journal of Virology** 79(4): 2432-2439, 2005.
- PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunology and Cell Biology** 85(1): 43-45, 2007.
- PEISER, L.; MUKHOPADHYAY, S.; GORDON, S. Scavenger receptors in innate immunity. **Current Opinion in Immunology** 14(1): 123-128, 2002.

- PEREZ, A. B., *et al.* IL-10 levels in Dengue patients: some findings from the exceptional epidemiological conditions in Cuba. **The Journal of Medical Virology** 73(2): 230-234, 2004.
- PINTO, L. M., *et al.* Increased pro-inflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6) and anti-inflammatory compounds (sTNFRp55 and sTNFRp75) in Brazilian patients during exanthematic dengue fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 94(3): 387-394, 1999.
- PLATT, N.; GORDON, S. Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale. **Journal of Clinical Investigation** 108(5): 649-654, 2001.
- POLTORAK, A., *et al.* Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. **Science** 282(5396): 2085-2088, 1998.
- POUSSIN, C., *et al.* CD14-dependent endotoxin internalization via a macropinocytic pathway. **The Journal of Biological Chemistry** 273(32): 20285-20291, 1998.
- QURESHI, S. T., *et al.* Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4). **Journal of Experimental Medicine** 189(4): 615-625, 1999.
- REINERT, J. F.; HARBACH, R. E. Generic and subgeneric status of aedine mosquito species (Diptera : Culicidae : Aedini) occurring in the Australasian Region. **Zootaxa**(887): 1-10, 2005.
- RIGAU-PEREZ, J. G. The early use of break-bone fever (quebranta huesos, 1771) and dengue (1801) in Spanish. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 59(2): 272-274, 1998.
- RODENHUIS-ZYBERT, I. A., *et al.* Immature dengue virus: a veiled pathogen? **PLoS Pathogens** 6(1): e1000718, 2010.

- ROTHMAN, A. L. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. **Nature Reviews Immunology** 11(8): 532-543, 2011.
- ROTHMAN, A. L.; ENNIS, F. A. Immunopathogenesis of Dengue hemorrhagic fever. **Virology** 257(1): 1-6, 1999.
- SABIN, A. B. The dengue group of viruses and its family relationships. **Bacteriological Reviews** 14(3): 225-232, 1950.
- SABIN, A. B.; SCHLESINGER, R. W. Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. **Science** 101(2634): 640-642, 1945.
- SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Casos e focos 2011. **Programa de Controle da Dengue**. Disponível em: <[http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/Vetores/Situacao\\_da\\_Dengue\\_Casos\\_e\\_Focos\\_2011.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/Vetores/Situacao_da_Dengue_Casos_e_Focos_2011.pdf)>. Acesso em: 07 Fevereiro 2012.
- SANTA CATARINA. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Vigilância Epidemiológica. Casos e focos 2012. **Programa de Controle da Dengue**. Disponível em: <[http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/Vetores/Situacao\\_da\\_Dengue\\_Casos\\_e\\_Focos\\_2012.pdf](http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/zoonoses/Vetores/Situacao_da_Dengue_Casos_e_Focos_2012.pdf)>. Acesso em: 07 Fevereiro 2012.
- SASADA, M.; PABST, M. J.; JOHNSTON, R. B., JR. Activation of mouse peritoneal macrophages by lipopolysaccharide alters the kinetic parameters of the superoxide-producing NADPH oxidase. **The Journal of Biological Chemistry** 258(16): 9631-9635, 1983.
- SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; ROSA, A. P. A. T. D. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 81: 245-246, 1986.



- SCHIFF, D. E., *et al.* Phagocytosis of gram-negative bacteria by a unique CD14-dependent mechanism. **Journal of Leukocyte Biology** 62(6): 786-794, 1997.
- SCHULZ, O., *et al.* Toll-like receptor 3 promotes cross-priming to virus-infected cells. **Nature** 433(7028): 887-892, 2005.
- SEET, R. C.; QUEK, A. M.; LIM, E. C. Post-infectious fatigue syndrome in dengue infection. **The Journal of Clinical Virology** 38(1): 1-6, 2007.
- SEN, M. K., *et al.* Dengue hemorrhagic fever (DHF) presenting with ARDS. **The Indian journal of chest diseases & allied sciences** 41(2): 115-119, 1999.
- SHNYRA, A.; LINDBERG, A. A. Scavenger receptor pathway for lipopolysaccharide binding to Kupffer and endothelial liver cells in vitro. **Infection and Immunity** 63(3): 865-873, 1995.
- SHRESTA, S., *et al.* Interferon-dependent immunity is essential for resistance to primary dengue virus infection in mice, whereas T- and B-cell-dependent immunity are less critical. **The Journal of Virology** 78(6): 2701-2710, 2004.
- SHU, P. Y., *et al.* Development of group- and serotype-specific one-step SYBR green I-based real-time reverse transcription-PCR assay for dengue virus. **The Journal of Clinical Microbiology** 41(6): 2408-2416, 2003.
- SIEGAL, F. P., *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. **Science** 284(5421): 1835-1837, 1999.
- SIMMONS, C. P., *et al.* Patterns of host genome-wide gene transcript abundance in the peripheral blood of patients with acute dengue hemorrhagic fever. **The Journal of Infectious Diseases** 195(8): 1097-1107, 2007.

- STEPHENSON, J. R. Understanding dengue pathogenesis: implications for vaccine design. **Bulletin World Health Organization** 83(4): 308-314, 2005.
- STRAMER, B. M.; MORI, R.; MARTIN, P. The inflammation-fibrosis link? A Jekyll and Hyde role for blood cells during wound repair. **The Journal of Investigative Dermatology** 127(5): 1009-1017, 2007.
- SUMPTER, R., JR., *et al.* Regulating intracellular antiviral defense and permissiveness to hepatitis C virus RNA replication through a cellular RNA helicase, RIG-I. **The Journal of Virology** 79(5): 2689-2699, 2005.
- SUN, P., *et al.* Functional characterization of ex vivo blood myeloid and plasmacytoid dendritic cells after infection with dengue virus. **Virology** 383(2): 207-215, 2009.
- SUZUKI, M.; HISAMATSU, T.; PODOLSKY, D. K. Gamma interferon augments the intracellular pathway for lipopolysaccharide (LPS) recognition in human intestinal epithelial cells through coordinated up-regulation of LPS uptake and expression of the intracellular Toll-like receptor 4-MD-2 complex. **Infection and Immunity** 71(6): 3503-3511, 2003.
- THIEBLEMONT, N.; WRIGHT, S. D. Mice genetically hyporesponsive to lipopolysaccharide (LPS) exhibit a defect in endocytic uptake of LPS and ceramide. **Journal of Experimental Medicine** 185(12): 2095-2100, 1997.
- TOBIAS, P. S., *et al.* Lipopolysaccharide binding protein-mediated complexation of lipopolysaccharide with soluble CD14. **The Journal of Biological Chemistry** 270(18): 10482-10488, 1995.
- TRIANTAFILOU, M., *et al.* Mediators of innate immune recognition of bacteria concentrate in lipid rafts and facilitate lipopolysaccharide-induced cell activation. **Journal of Cell Science** 115(Pt 12): 2603-2611, 2002.

- TULLAI, J. W., *et al.* Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. **The Journal of Biological Chemistry** 282(33): 23981-23995, 2007.
- VALERO, N., *et al.* Short report: increased level of serum nitric oxide in patients with dengue. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 66(6): 762-764, 2002.
- VAUGHN, D. W., *et al.* Rapid serologic diagnosis of dengue virus infection using a commercial capture ELISA that distinguishes primary and secondary infections. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 60(4): 693-698, 1999.
- VISHNYAKOVA, T. G., *et al.* Binding and internalization of lipopolysaccharide by Cla-1, a human orthologue of rodent scavenger receptor B1. **The Journal of Biological Chemistry** 278(25): 22771-22780, 2003.
- VITARANA, T., *et al.* Elevated tumour necrosis factor in dengue fever and dengue haemorrhagic fever. **Ceylon Medical Journal** 36(2): 63-65, 1991.
- WANG, C. C., *et al.* Acute respiratory failure in adult patients with dengue virus infection. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 77(1): 151-158, 2007.
- WANG, E., *et al.* Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. **The Journal of Virology** 74(7): 3227-3234, 2000.
- WANG, L., *et al.* DC-SIGN (CD209) Promoter -336 A/G polymorphism is associated with dengue hemorrhagic fever and correlated to DC-SIGN expression and immune augmentation. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 5(1): e934, 2011.
- WATTS, D. M., *et al.* Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** 36(1): 143-152, 1987.

- WHITEHEAD, S. S., *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. **Nature Reviews Microbiology** 5(7): 518-528, 2007.
- WHO. World Health Organisation. **Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control**. New edition Geneva: World Health Organisation; 2009. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>>. Acesso em: 01 Fevereiro 2012.
- WHO. World Health Organisation. **Guidelines for Treatment of Dengue Fever / Dengue Haemorrhagic Fever in Small Hospitals**. WHO Regional Office for South-East Asia Publication 1999. Disponível em: <[http://www.searo.who.int/LinkFiles/Dengue\\_Guideline-dengue.pdf](http://www.searo.who.int/LinkFiles/Dengue_Guideline-dengue.pdf)>. Acesso em: 05 Fevereiro 2012.
- YONEYAMA, M.; FUJITA, T. RIG-I family RNA helicases: cytoplasmic sensor for antiviral innate immunity. **Cytokine & Growth Factor Reviews** 18(5-6): 545-551, 2007.
- YOU, S., *et al.* In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. **Journal of Biological Chemistry** 276(19): 15581-15591, 2001.
- ZAREMBER, K. A.; GODOWSKI, P. J. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. **The Journal of Immunology** 168(2): 554-561, 2002.
- ZHANG, W., *et al.* Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. **Nature Structural Biology** 10(11): 907-912, 2003.
- ZIVNA, I., *et al.* T cell responses to an HLA-B\*07-restricted epitope on the dengue NS3 protein correlate with disease severity. **The Journal of Immunology** 168(11): 5959-5965, 2002.

